

Anssi Vuorensyrjä

Metabolien entsyymien geeniekspressiotason määrittäminen rotan mahalaukun totaali-RNA:sta RT-qPCR-menetelmällä

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalytiikka (AMK)

Laboratorioala

Opinnäytetyö

3.12.2015

Tekijä Otsikko	Anssi Vuorensyrjä Metaboliaentsyymien geeniekspressiotason määrittäminen rotan mahalaukun totaali-RNA:sta RT-qPCR-menetelmällä
Sivumäärä Aika	43 sivua + 2 liitettä 4.12.2015
Tutkinto	Laboratorioanalyttikko (AMK)
Koulutusohjelma	Laboratorioalan koulutusohjelma
Suuntautumisvaihtoehto	Biotieteet
Ohjaaja(t)	Raimo Pohjanvirta, toksikologian professori Selma Mahiout, tohtorikoulutettava Katri Juuti, FT
<p>Opinnäytetyön aiheena oli kahden metaboliaentsyymien geeniekspressiotason määrittäminen RT-qPCR-menetelmällä rotan mahalaukun kudoksista. Työ oli osa aryylihiilivetyreseptorin (AHR) ja AHR-agonistien tutkimusta Helsingin yliopiston Eläinlääketieteellisessä tiedekunnassa, Elintarvikehygienian- ja ympäristöterveyden osastolla.</p> <p>Dioksiinien vaikutusten tiedetään välittyvän AHR:n kautta ja niistä TCDD:n (2,3,7,8-tetraklooridibentso-<i>p</i>-dioksiini) on huomattu aiheuttavan alhaisilla pitoisuuksilla rotilla aversiota eli vastenmielisyyttä uusia ruoka-aineita kohtaan. Ilmiön yhteydessä on havaittu sytokromi P450:n metaboliaentsyymien (erityisesti <i>cyp1a1</i>) geeniekspressiotasojen muutoksia rotan maksan kudoksissa. Viimeisimmissä jatkotutkimuksissa AHR-agonistin (C2) toksista vaikutusta on tutkittu yhdessä CAR-agonistin (TPD) ja AHR-antagonistin (CH-223191) kanssa rotan mahalaukun kudoksista. Opinnäytetyö perustui viimeisiin tutkimuksiin.</p> <p>Työn tavoitteena oli selvittää, löytyykö rottien aversion ja mahalaukun kudosten geeniekspression väliltä yhteyttä. Mahalaukun kudoksista eristettiin totaali-RNA, joka puhdistettiin DNAasilla ja käännettiin cDNA:ksi. <i>Cyp1a1</i> ja <i>cyp2b1</i> metaboliaentsyymigeenien ekspressiota mitattiin spesifeillä alukkeilla käyttäen RT-qPCR-tekniikkaa, jossa käytettiin fluoresoivaa EvaGreen-väriainetta. Opinnäytetyössä arvioitiin metaboliaentsyymien geeniekspressiotasojen määrittämisen onnistumista erityisesti tekniseltä kannalta.</p> <p>Tulosten mukaan uusi AHR-agonisti (C2) aiheutti rotissa entsyymi-induktiota, mikä saattaa olla yhteydessä aversioon suklaalle. Samankaltaista aversiota ovat aiheuttaneet myös aiemmin tutkitut AHR-agonistit. Puolestaan CAR-agonistilla (TPD) ei vastaavaa vaikutusta ilmennyt ollenkaan. Aversio näyttää liittyvän suoraan AHR:n toimintaan. <i>Cyp1a1</i> metaboliaentsyymigeenin ekspressiotasot määritettiin melko luotettavasti ($R^2=0,9996$). <i>Cyp2b1</i> metaboliaentsyymigeenin ekspressiotasot olivat luotettavuudeltaan välttäviä ($R^2=0,9879$), koska kalibrintisuoran sensitiivisyys ei riittänyt kaikkien näytteiden pitoisuusalueelle. Sulamiskäyräanalyyysien perusteella havaittiin myös mahdollisesti vikaa Rotor-Gene-laitteen kalibroinnissa.</p> <p>Tutkimuksia voidaan jatkaa huoltamalla tai kalibroimalla Rotor-Gene-laite, jolloin mahdollisesti laitteesta johtuva vika saataisiin paikannettua vertaamalla sulamiskäyräanalyysejä. Päätelmiä AHR:n molekulaarisesta mekanismista voidaan tehdä analysoimalla tuloksia tilastollisesti esimerkiksi SPSS-ohjelmalla.</p>	
Avainsanat	AHR, aversio, geeniekspressio, metaboliaentsyymi, RT, qPCR

Author(s) Title	Anssi Vuorensyrjä Determination of the gene expression of metabolic enzymes from rat stomach total RNA by RT-qPCR
Number of Pages Date	43 pages + 2 appendices 4.12. 2015
Degree	Bachelor of Laboratory Sciences
Degree Programme	Laboratory Sciences
Specialisation option	Biosciences
Instructor(s)	Raimo Pohjanvirta, Professor of Toxicology Selma Mahiout, Doctoral student Katri Juuti, PhD
<p>The Bachelor's thesis project was a part of Aryl hydrocarbon receptor (AHR) and AHR-agonists studies in the Department of Food Hygiene and Environmental Health, in the Faculty of Veterinary Medicine, at the University of Helsinki. The thesis focused on two metabolic enzymes whose gene expression was determined from isolated total RNA of rat stomach tissue with RT-qPCR.</p> <p>In the cell the metabolic response of dioxins is mediated by the AHR. The most potent AHR-agonist 2, 3, 7, 8-Tetrachlorodibenzo-<i>p</i>-dioxin (TCDD) has an inducing effect on gene expression of cytochrome P450's metabolic enzymes (<i>Cyp1a1</i>) in rat liver. Exposure to below-toxic doses of TCDD caused strong aversion towards novel food items in rats, which correlated with increasing levels of <i>cyp1a</i> gene expression in the liver. In the recent studies, the toxic effect of an AHR-agonist (C2) has been examined with a CAR-agonist (TPD) and an AHR-antagonist (CH-223191) in rat stomach. The thesis is based on the latest experiments.</p> <p>The goal of the study was to examine a relation between the aversion and the gene expression of metabolic enzymes in rat stomach. The total RNA was isolated from the stomach tissue, later purified with DNAase and then reverse transcribed to cDNA. The gene expression levels of <i>Cyp1a1</i> and <i>cyp2b1</i> were measured with specific primers and EvaGreen fluorescent marker by RT-qPCR. The thesis focused on the evaluation of technical performance of the used RT-qPCR-method.</p> <p>According to results, the new AHR-agonist (C2) induced enzyme induction which may be associated with total aversion towards novel chocolate. The previous AHR agonists indicated similar aversion. The CAR-agonist (TPD) failed to elicit chocolate aversion. Aversion seems to be directly related to mechanisms of AHR. The determined gene expression levels of <i>cyp1a1</i> were pretty reliable ($R^2=0,9996$). The reliability of the determined gene expression levels of <i>cyp2b1</i> were mediocre ($R^2=0,9879$) because the calibration curve lacked sensitivity on most of the sample signals. The melting curve analysis indicated that the Rotor-Gene-qPCR-device required re-calibration.</p> <p>In future studies, the next step would be maintaining or re-calibrating Rotor-Gene-qPCR-device and performing comparative troubleshooting with melting curve graphs. Further conclusions about molecular mechanism of AHR may be performed with data mining tool such as SPSS statistical analysis software.</p>	
Keywords	AHR, aversion, gene expression, metabolic enzyme, RT, qPCR

Sisällys

1	Johdanto	1
2	Vierasaineiden metabolia	2
2.1	Sytokromi P450-entsyymit	3
2.2	Aryylihiilivetyreseptori	4
2.2.1	AHR-aktivaatio	5
2.2.2	Biologinen mekanismi	7
2.3	CAR-tumareseptori	9
3	RT-qPCR	10
3.1	qPCR-tekniikka	11
3.2	Normalisaatio	12
3.3	Kalibrointikuvaaja	13
3.4	EvaGreen-sovellus	14
4	Menetelmät ja materiaalit	17
4.1	Rotor-Gene 3000	18
4.2	Alukkeet	20
4.3	Koeasetelma	20
4.4	Kudospalojen leikkaaminen	21
4.5	RNA-eristys	21
4.6	DNAasikäsittely	22
4.7	cDNA-synteesi	23
4.8	RT-qPCR (<i>Cyp1a1</i> , <i>Cyp2b1</i>)	25
4.8.1	Standardien synteesi	25
4.8.2	qPCR-reaktiot	29
5	Tulokset	31
6	Tulosten tarkastelu	36
7	Yhteenveto	40
	Lähteet	42

Liitteet

Liite 1. Rottien koeasetelma ja materiaalit

Liite 2. Mittaustulokset

Lyhenteet

AHR	Aryl hydrocarbon receptor, aryylihiilivetyreseptori
AHRR	AHR-induced-AHR-repressor, AH-reseptorin repressori
ARNT	Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator, aryylihiilivetyreseptori-translokaatio-proteiini
CAR	Constitutive androstane receptor, CAR-tumareseptori
cDNA	Komplementaarinen DNA
CYP450	Sytokromi P450
CYP1A1	CYP450 metaboliaentsyymi
<i>Cyp1a1</i>	CYP450 geeni
CYP2B1	CYP450 metaboliaentsyymi
<i>Cyp2b1</i>	CYP450 geeni
HAH	Halogenoidut aromaattiset hiilivety-yhdisteet
LD ₅₀	Yhdisteen konsentraatio, jonka altistumisessa 50 % koe-eläimistä kuolee.
PAH	Polysykliset aromaattiset hiilivety-yhdisteet
RT-qPCR	Reverse Transcriptase Quantitative Polymerase Chain Reaction Kvantitatiivinen käänteistranskriptaasi-polymeraasiketjureaktio
TCDD	2,3,7,8-tetraklooridibentso- <i>p</i> -dioksiini
XRE	vierasaineita metaboloivien geenien säätely-yksikkö (Xenobiotic Response Element)

1 Johdanto

Opinnäytetyö suoritettiin Helsingin yliopiston Eläinlääketieteellisessä tiedekunnassa, Elintarvikehygienian- ja ympäristöterveyden osastolla. Toksikologian professori Raimo Pohjanvirran ryhmässä on tutkittu erityisesti aryylihiilivetyreseptorin (AHR) kautta ilmenviä dioksiinien ja muiden AHR-agonistien vaikutuksia sekä AHR-reseptorin molekulaarisia mekanismeja.

AHR on ligandi-aktivoituva transkriptiotekijä, joka välittää muun muassa dioksiinien toksisia vaikutuksia. Dioksiinit ovat ympäristön vierasaineita ja halogenoituneita aromaattisia hiilivety-yhdisteitä, joista toksisin on 2,3,7,8- tetraklooridibentso-*p*-dioksiini (TCDD). Hiljattain on huomattu, että altistuminen alhaisille pitoisuuksille TCDD:tä aiheuttaa rotilla voimakasta aversiota uusia ruoka-aineita kohtaan, minkä on huomattu korreloivan maksan metaboliaentsyymien ilmentymisen kanssa. Erityisesti maksan metaboliaentsyymi CYP1A1:n mRNA-pitoisuudet näyttivät korreloivan potenteimman AHR-agonistin TCDD:n aiheuttaman aversion kanssa. [8.] Muiden AHR-agonistien ja maksan entsyymien geeniekspression välillä ei havaittu samanlaista korrelaatiota. Metaboliaentsyymien geeniekspressiotason tutkimuksia on jatkettu uusilla AHR-agonisteilla. [7.]

Opinnäytetyön tavoitteena oli selvittää, löytyykö rottien aversion ja mahalaukun kudoksien metaboliaentsyymien geeniekspressiotason väliltä yhteyttä RT-qPCR-menetelmällä. Opinnäytetyön materiaalina oli valmiiksi pakastettuja rotan mahalaukun kudospalanäytteitä. Kudospalanäytteet olivat neljästä eri kokeesta, joissa tutkittiin kolmen erilaisen aineen kykyä aiheuttaa rotissa aversiota uudelle ruoka-aineelle, suklaalle. Testatut aineet olivat AHR-antagonisti CH-223191, uusi AHR-agonisti C2 ja CAR-tumareseptoria aktivoiva TPD (2,4,6-tryphenyldioxane-1,3). Kudospaloista eristettiin aluksi totaali-RNA, jonka jälkeen näytteet DNAasikäsiteltiin ja käännettiin cDNA:ksi. Metaboliaentsyymien geenien (*Cyp1a1* ja *Cyp2b1*) ekspressiota mitattiin cDNA:sta RT-qPCR:llä eri koeryhmissä. RT-qPCR-menetelmän tehokkuutta ja tulosten luotettavuutta arvioitiin teknisen onnistumisen kannalta.

2 Vierasaineiden metabolia

Ksenobioottien metaboliolla tarkoitetaan vierasaineiden aineenvaihdunnan reaktioita, joiden tarkoitus on muuntaa haitalliset vierasaineet harmittomampaan muotoon ja erittää ne pois organismista. Vierasaineiden metaboliassa esimerkiksi PAH-ja HAH-yhdisteet (Halogenoidut/polysykliset aromaattiset hiilivedyt) metaboloituvat muun muassa sytokromi P450:n entsyymeillä. Muita yhteistyössä vaikuttavia entsyymeitä ovat mm. epoksidihydrolaasi (EH), glutationitransferaasi (GST) ja sulfotransferaasi (SULT). [21, s.257-258.]

Aineenvaihdunta hapettaa metaboliaentsyymeillä aromaattisia rasvaliukoisia molekyylejä vesiliukoisempaan muotoon, joka poistuu elimistöstä nopeammin virtsan mukana. Monet tumareseptorit (CAR) ja orporeseptorit, joista myös AHR, osallistuvat detoksikaation vaiheiden metaboliaentsyymien säätelyyn. Reseptorit aktivoivat metaboliaentsyymien transkriptiota kiinnittymällä CYP-geenien 5'-pään promootorialueelle, mikä aloittaa mRNA:n synteessin kohdegeenistä. Translaatiossa muokatut CYP-proteiinit aloittavat vierasaineiden detoksikaation. [3, s 249 -250.]

Detoksikaatioaineenvaihdunta voidaan jakaa transformaatioon (1. vaihe), jossa sytokromi P450:n entsyymit tuottavat polaarisia hydroksyyli-ryhmiä vierasaineisiin monoksygenaatio-reaktioilla, ja konjugaatioon (2. vaihe), jossa yhdisteet muokataan polaariseen, vähemmän aktiiviseen ja vesiliukoisempaan muotoon. Vaiheiden 1. ja 2. aineenvaihdunta voi myös bioaktivoida passiivisia ksenobioottisia yhdisteitä harmillisempaan muotoon, mitkä voivat olla vaikutuksiltaan esimerkiksi karsinogeenisiä, mutageenisia tai nekroosia aiheuttavia. [21, s. 257.] Vaiheessa 3. metaboliaentsyymit jatkokäsittävät konjugoituneet yhdisteet, jonka jälkeen siirtäjät (effuksi transportteri) erittävät muokatut yhdisteet ulos organismista. [3, s.260 -261.] Ksenobioottien poistuminen vaihtelee ihmisten välillä, riippuen geneettisistä eroista, kuten sytokromi P450 (CYP-450)-entsyymien isoformeista, hormoneista, sukupuolesta, iästä, sairauksista ja ympäristötekijöistä. [4, s.739 -740.]

2.1 Sytokromi P450-entsyymit

Sytokromi P450:n metaboliaentsyymejä on tunnistettu nisäkkäistä bakteereihin noin 18000 kappaletta. Useat CYP-entsyymit säätelevät luontaisesti monia organismin rasvahappojen, steroidien ja niiden hormonien biosynteesiä. Vierasaineiden metaboliaan osallistuvat sytokromi P450:n entsyymit sijaitsevat pääasiassa organismin maksan kudoksissa, mutta niitä esiintyy myös esimerkiksi ruuansulatuskanavassa. [4, s.737 -738.] Tässä työssä on tutkittu metaboliaentsyymigeenien *cyp1a1* ja *cyp2b1* ekspressiotasoja mahalaukussa.

Cyp1a1 on proteiinia koodaava geeni, joka kuuluu CYP-450:n entsyymeihin. Metaboliaentsyyminä CYP1A1 osallistuu HAH/PAH-yhdisteiden ja lääkeaineiden aineenvaihduntaan. CYP1A1-metaboliaentsyymin geeniekspressiota indusoi AHR, mikä on mm. osoitettu AHR-knockout-hiirien kokeilla. [3, s. 255.]

Cyp2b1 on proteiinia koodaava geeni, joka kuuluu CYP-450:n fenobarbitaalisten indusoijien (lääkeaineet) entsyymeihin, jotka osallistuvat dekaanihapon ja muiden rasvahappojen hydroksylaatioon. CYP2B1-metaboliaentsyymin geeniekspressiota indusoi CAR-tumareseptori. [3, s. 255.] *Cyp1a1* ja *cyp2b1* ovat hyvin konservoituneita geenejä mm. rotilla ja ihmisillä. Metaboliaentsyymien vertailu on esitetty taulukossa 1. [14.]

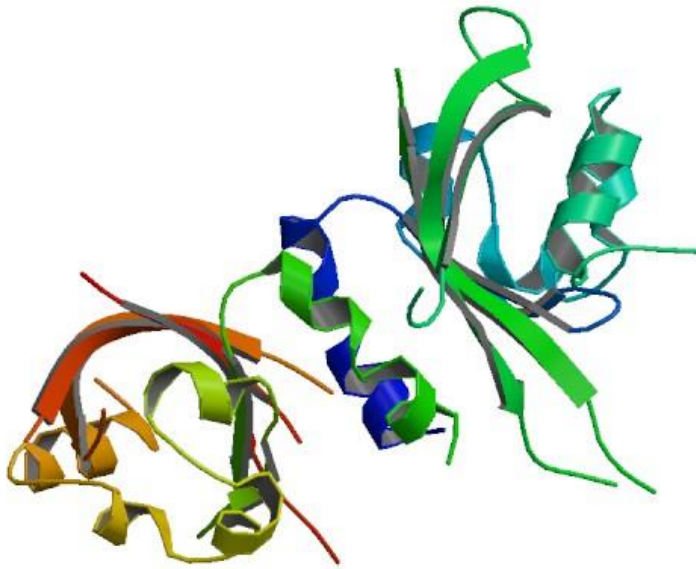
Taulukko 1. Rotan CYP1A1 ja 2B1 metaboliaentsyymien vertailu. [13.][14.]

Metaboliaentsyymit	CYP1A1	CYP2B1
kokonimi	cytochrome P450, family 1, subfamily a, polypeptide 1	cytochrome P450, family 2, subfamily b, polypeptide 1
Organismi	Rattus Norvegicus	Rattus Norvegicus
Sijainti	Endoplasminen retikulum	Endoplasminen retikulum
Geenin tyyppi	proteiinia koodaava	proteiinia koodaava
Sijainti	kromosomi 8	Kromosomi 7
Eksonit	7	12
Koko(mRNA)	2615 bp	1905 bp
Vaihtoehtoiset sekvensoinnit	1 (ehdotettu)	3 (ehdotettu)
Sekvensointien koko	2618bp	2289 bp, 1903 bp, 1927bp
Yhteenveto	Mono-oksygenaasi, joka osallistuu dioksiinien metaboliaan ja detoksikaatioon.	Fenobarbitaalinen indusoija, joka osallistuu rasvahappojen hydroksylaatioon.

2.2 Aryylihiilivetyreseptori

Aryylihiilivetyreseptori (AHR) on yksi useista ligandi-aktivoituvista transkriptiotekijöistä, jotka säätelevät laajasti muun muassa solun metaboliaentsyymien geenejä. AHR säätelee erityisesti sytokromi P450:n ksenobiootteja (vierasaineita) metaboloivien entsyymien geeniekspressiota. Metaboliaentsyymien geenien ilmentymisen säätely on organismin luonnollinen kyky sopeutua altistuttaessa ympäristön vierasaineille. Sytokromi P450:n säätelemistä entsyymeistä yksi paljon tutkituista on metaboliaentsyymi CYP1A1, jonka AHR:n säätelymekanismien kautta tyypillisesti kuvaillaan AHR:n biologian vuorovaikutussuhteita. [2, s. 309 -310.]

AHR on evoluution aikana konservoitunut proteiini, joka kuuluu basic helix-loop-helix – Per-ARNT-Sim (bHLH/PAS)-perheeseen (kuva 1). Tyypillisesti tämän perheen proteiinit osallistuvat viestinnän ja energiametabolian säätelyyn organismin vuorokausirytmien ja syömisensäätelymekanismeissa. AHR aktivoituu ksenobioottisessa stressissä ja sillä vaikuttaa olevan merkittävä rooli transkriptiotekijänä kasvun ja kehityksen säätelyssä. [1, s. 62 -63.] Kuvassa 1 on esitetty AHR:n PAS-A domeenin dimerisaatio ja tertiäärinen rakenne.



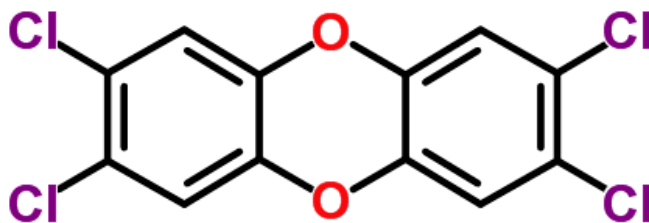
Kuva 1. Aryylihiilivetyreseptorin (AHR) PAS-A domeenin dimerisaatio ja tertiäärinen rakenne. Proteiininiketjut on väritetty N-terminaalista C-terminaaliin näkyvän valon spektrin mukaan (violetti-punainen) [19.]

Kuvassa 1 esitetyn perheen proteiinit ovat transkriptiotekijöinä tyypillisiä nisäkäsproteiineja, joiden rakenne koostuu DNA:n sitoutumisen ja proteiinin dimerisaation aladomeeneista. AHR:n PAS-B-domeinissa on sitoutumiskohta endo- tai eksogeeniselle ligandille. N-terminaalinen osa pitää sisällään bHLH- ja PAS-domeenit, johon kuljetusproteiinikompleksi (Hsp90/XAP2/p23) kiinnittyy. Proteiinin emäksinen (basic) osa kiinnittyy DNA:han ja helix-loop-helix-rakenne yhdessä PAS-domeenin kanssa määrittää proteiinin konformaatiota ennen ja jälkeen ligandiaktivaation. AHR:n C-terminaalisessa päässä on transaktivaatiodomeini (kuva 1). [19.]

2.2.1 AHR-aktivaatio

AHR aktivoituu muun muassa ravinnon kautta organismissa esiintyvistä yhdisteistä, kuten flavonoideista. Ne ovat laajasti kartoitettuja AHR-ligandeja, jotka eivät ole toksisia. Useimmat näistä AHR-ligandeista ovat heikkoja AHR-agonisteja, jotka voivat suoraan aktivoida AHR:n, tai AHR-antagonisteja, jotka inhiboivat eli salpaavat sen. AHR luokitellaan toistaiseksi vielä orporeseptoriksi, koska sen fysiologisen roolin kannalta on vielä tunnistamatta sen korkea-affiniteettinen endogeeninen AHR-ligandi. On tunnistettu monia endogeenisiä AHR-ligandeja, jotka voivat sitoutua AHR:n ja indusoida AHR:n säätelmiä geeniekspressiotason muutoksia, mutta ne ovat suhteellisen heikkoja verrattuna eksogeenisiin HAH/PAH-yhdisteisiin. AHR sitoo laajasti eksogeenisiä (erityisesti halogenoituja) hiilivetyjä, joista HAH-yhdisteistä potenttein ja tutkituin AHR-agonisti on TCDD. Tyypillisesti ligandi-aktivoituvat reseptorit ovat todella spesifisiä solun luonnolliseen biologiaan kuuluvalla yhdisteelle, mutta AHR muistuttaa toiminnaltaan eräiden klassisten tuma-reseptorien (PPARs, CAR, PXR) toimintaa, jotka myös säätelävät laajasti ksenobiootteja metaboloivien entsyymien geeniekspressiota. Ne indusoivat AHR:n tavoin sytokromi P450:n entsyymeitä ja välittävät solun monimuotoista metabolista vastetta ympäristön vierasaineille. [2, s. 313, 323.]

AHR aktivoivat AHR-agonistit, joista monet ovat dioksiineja ja muita ympäristön halogenoituneita aromaattisia hiilivety-yhdisteitä (HAH). Ne ovat syntyneet teollisuuden kloori- ja fenoli-yhdisteiden epätäydellisistä palamisprosesseista ja ovat erittäin pysyviä ja rasvaliukoisia klooriyhdisteitä sekä bioakkumuloituvia ravintoketjussa. Metaboliaentsyymien aktiivisuuden säätelyn lisäksi AHR välittää dioksiinien toksisia vaikutuksia. Dioksiineista TCDD on potenttein AHR-agonisti ja avainasemassa AHR:n biologisen mekanismin tutkimuksessa. [1, s. 60.] TCDD-molekyylin rakenne on esitetty kuvassa 2.



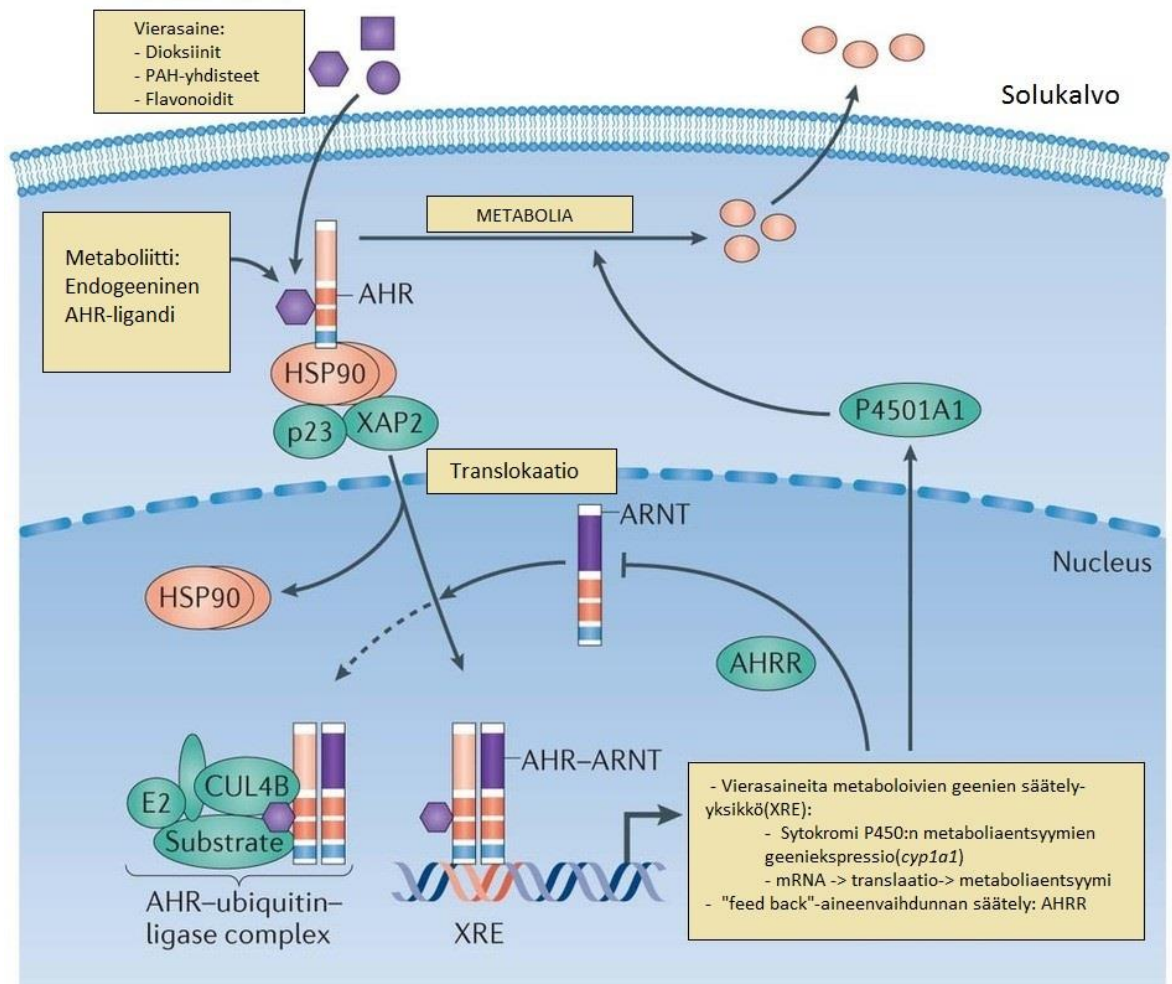
Kuva 2. TCDD (2,3,7,8-tetraklooridibentso-*p*-dioksiini). [18]

Dioksiinien toksisella vasteella on, yksittäin jyrsijöiden kohdalla, suuria eroavaisuuksia lajien, kantojen ja sukupuolten välillä. Esimerkiksi TCDD:n LD₅₀-arvo on 1 µg/kg marsuilla, 114 µg/kg hiirillä ja 5000 µg/kg hamstereilla. Suurille TCDD-pitoisuuksille altistuttaessa kaikilla jyrsijöillä havaitaan painon laskua, tuumorien kehittymistä ja kuihtumista, mikä johtaa lopulta kuolemaan n. 1-6 viikon kuluessa altistumisesta. TCDD on todella resistentti aromaattiselle hydroksylaatiolle, koska sen aromaattista rakennetta ympäröivät hyvin elektronegatiiviset klooriatomit (kuva 2). Täten TCDD ei metaboloidu ja poistuu elimistöstä hyvin hitaasti sekä lipofiilisenä molekyylinä bioakkumuloituu rasvakudokseen. [5, s.498.] Se keraantyy erityisesti maksaan kiinnittyneenä CYP1A1-metaboliant-syymiin. Dioksiinialtistumisella toksista annosta alhaisemmilla pitoisuuksilla TCDD:tä on huomattu olevan vaikutusta koe-eläimien käyttäytymiseen ja ruokahaluun. [1, s. 61]

Kaikki AHR-agonistit eivät ole toksisia, vaan monien agonistien aiheuttama AHR:n aktivoituminen aiheuttaa elimistölle välttämättömiä hyödyllisiä vaikutuksia [2, s.2, kpl 2]. Esimerkiksi ravinnon flavonoideja pidetään vaikutuksiltaan hyvin terveellisinä. TCDD:n ja muiden AHR-agonistien biologista vaikutusta solussa ei vielä täysin tunneta. AHR-agonistien toksisuus johtuu nykytiedon valossa AHR:n aktivaatiosta, joka johtaa muun muassa sytokromi P450:n metaboliaentsyymien geeniekspression muutokseen, jota säätelee ligandi-aktivoitunut AHR-ARNT(aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator)-kompleksi (kuva 3). Kyseisen aktivaation vaikutus voi olla suora AHR-ARNT-kompleksin säädeltäviin geeneihin tai epäsuora, jolloin AHR tai ARNT ei yksittäisenä osallistu jonkin toisen geeninsäätely-yksikön aktivoimiseen. AHR:n kaikkia säädeltäviä geenejä ei vielä tunneta. Sen indusoima sytokromi P450:n geenien ilmentyminen on vain yksi monista AHR:n säätelemistä geeniperheistä. AHR:n aktivaation tarkoitus on ympäristön signaalien välittäminen solulimasta tumaan ja säädellä organismin adaptoitumista ympäristöön [1, s. 83].

2.2.2 Biologinen mekanismi

AHR:n biologisen mekanismin tutkimus on keskittynyt sen rooliin toksisten vasteiden ilmentymisessä, jossa AHR:n on todettu ligandi-aktivoituvan dioksiinien kanssa. Tiedetään, että suurin osa dioksiinien biologisista vaikutuksista välittyy aryylihiilivetyreseptorin välityksellä. Dioksiinien tutkimuksilla on paikannettu muutamia sytokromi P450:n geenejä (mm. *Cyp1a1*), jotka aktivoituvat AHR:n säätelymekanismien kautta. CYP1A1-entsyymin katalyyttistä aktiivisuutta ilmentää aryylihiilivetyhydroksilaasi (AHH), joka indusoiduu aromaattisten hiilivetyjen vaikutuksesta ja aktivoi niiden katabolisen metaboliareitin AHR:n kautta. Kuvassa 3 on esitettyä AHR:n ligandiaktivaatio ja ksenobioottisen vasteen mekanismi.



Nature Reviews | Cancer

Kuva 3. AHR:n ligandiaktivaatio ja ksenobioottisen vasteen mekanismi. Eksogeeninen tai endogeeninen ligandi sitoutuu AHR-kuljettajaproteiini-dimer-kompleksiin. Tumassa se muodostaa AHR-ARNT-dimer kompleksin XRE:n kanssa kiinnittymällä DNA:han, mikä aktivoi mm. *Cyp1a1* (P4501A1) geeniekspressiota. Kuvaa 3 on muokattu. [17.]

AHR on ennen ligandiaktivaatiota inaktiivisena solulimassa sitoutuneena Hsp90:n, p23:n ja XAP2:n muodostamaan kuljetusproteiinikompleksiin (kuva 3). Kompleksi muokkaa AHR:n konformaation ligandisitoutumiselle spesifiseksi, estää kompleksin ennenaikaista translokaatiota tumaan ja ehkäisee ennenaikaista dimerisaatiota ARNT-proteiinin kanssa. Lipofiilinen vierasaine siirtyy diffuusiolla soluun ja kiinnittyy solulimassa AHR:n. AHR:n konformaatio muuttuu, kun se aktivoituu endo- tai eksogeenisen yhdisteen ligaatiossa, jonka jälkeen kuljetusproteiinikompleksi ohjaa translokaatiossa AHR:n tumaan. Tumassa kuljetusproteiinikompleksi irtaava AHR:sta, jonka jälkeen AHR:n uusi konformaatio mahdollistaa dimerisoitumisen ARNT-proteiinin kanssa. ARNT-dimeeri ei osallistu AHR-kompleksin siirtämiseen tumaan, mutta muokkaa muodostuneen AHR-ARNT-dimeerin konformaation korkeaaffiniteettiseksi spesifisen DNA:n suhteen. Aktivoitunut AHR-ARNT-dimeeri kiinnittyy DNA:han AHR:n säätelemien geenien promootorialueille ja aktivoi geeniekspression transkriptiovaiheen. AHR-ARNT-dimeerin ja vierasaineita metaboloivien geenien säätely-yksikön (XRE) kompleksin muodostama kokonaisuus indusoi koko sytokromi P4501A1:n geeniekspressiota, jonka proteiinit (mm. CYP1A1) ovat avainasemassa vierasaineiden metabolian alkuvaiheessa ja AHR:n aktivaatiossa. [13, 2, s. 309 -311.]

Sytokromi-P4501A1:n transkriptoitu mRNA ja translaation proteiinit osallistuvat vierasaineiden ”feedback”-aineenvaihdunnansäätelyyn (kuva 3). *Cyp1a1*-geenin transkription päätyttyä AHR-indusoitunut AHR-repressori (AHRR) vapautuu ja muodostaa ARNT:n kanssa transkriptiohiljentäjäkompleksin (AHRR-ARNT), joka toimii inhibiittorina ja kilpailee sitoutumisesta AHR-ARNT-transkriptioaktivaattoridimeerin kanssa. AHRR-ARNT -dimeeri sitoutuu XRE-DNA:han, mikä hiljentää *cyp1a1*:n geeniekspressiota. [17.]

AHR-ARNT-dimeeri voi myös muodostaa CUL4B:n kanssa AHR-ubikvitiini-ligaasi-kompleksin (kuva 3), joka käynnistää ubikvitiini-proteosomaalisen proteiinin hajotuksen kohteinaan ainakin estrogeenireseptori, androgeenireseptori ja β -kateniini. Ligandiaktivoituva AHR toimii CUL4B^{AHR}-kompleksin substraattispesifisenä adapterina, joka säätelee yhtenä osana kohdeproteiinien ubikvitinaatiota ja hajotusta. [20.]

AHR:n biologiset säätelymekanismit osallistuvat vierasaineiden aineenvaihdunnan viestinvälittämiseen tumaan. Säätelymekanismit, joihin AHR osallistuu, vaikuttavat olevan hyvin kudosspesifisiä, luultavasti paljon monimutkaisempia kuin tiedetään ja biologisilta vuorovaikutussuhteiltaan vielä kovin epäselviä. [1, s. 83.]

2.3 CAR-tumareseptori

Ksenobioottien metaboliaan osallistuu AHR:n lisäksi useita muita reseptoreita, joista yksi keskeisimmistä on CAR (Constitutive androstane receptor) -tumareseptori, joka voidaan luokitella myös orpo-reseptorien perheeseen. Opinnäytetyössä koeasetelmassa käytettiin AHR-agonisti C2:n lisäksi myös TPD:tä, joka on fenobarbitaalinen CAR-tumareseptori-agonisti, jolla on maksan CYP2B1-metaboliaentsyymien ilmentymistä tehostava vaikutus.

Reseptorina CAR toimii endogeenisten ja eksogeenisten yhdisteiden sensorina ja yhteistyössä muiden reseptorien kanssa osallistuu haitallisten yhdisteiden detoksikaatioon. CAR-tumareseptori on luokiteltu jatkuvasti aktiivisiin reseptoreihin, koska se dimerisoituu ligandien puutteessa RXR (Retinoid X Receptor) -reseptorin kanssa ja indusoi säätelemään geenejä. CAR-tumareseptori ilmentyy pääasiassa maksan kudoksissa ja vähemmän muissa sisäelimissä. Sen endogeenisiä ligandeja ovat androstaani, androstenoli ja androstenolin metaboliitit. Ne ovat CAR-antagonisteja, jotka hajottavat CAR-reseptorin sitoutumisen RXR-koaktivaattorista ja aktivoimisen sijaan inhiboivat CAR-tumareseptorin transaktivaatiota.

CAR-ligandien puutteessa CAR-tumareseptori sijaitsee maksasolujen solulimassa, josta CAR-agonistit ja fenobarbitaalilääkeaineen kaltaiset CYP2B:n indusoiijat saavat sen translokoitumaan tumaan. Translokaatiossa CAR siirtyy AHR:n tavoin solulimasta tumaan ja kiinnittyy spesifiseen DNA:han vaikuttaen usean kohdegeenin ekspressioon (mm. *Cyp2b1*). Erityisesti *cyp2b1*-geenin proteiinituotteet osallistuvat maksan vierasainien aineenvaihduntaan. CAR-tumareseptorin aktivaatio vaikuttaa olevan monitasoinen. Reseptorin translokaatio voi tapahtua myös ilman ligandia, mutta lopullinen aktivaatio tapahtuu eri säätelytekijöiden kautta. [3, s. 253.] Taulukossa 2 rotan AHR ja CAR -reseptoreita on vertailtu keskenään.

Taulukko 2. Rotan AHR ja CAR-tumareseptorin vertailu. [15.] [16.]

Reseptorit	AHR	CAR
Kokonimi	Aryl Hydrocarbon receptor	Nuclear receptor subfamily 1, group I, member 3
Organismi	<i>Rattus Norvegicus</i>	<i>Rattus Norvegicus</i>
Geeni	<i>ahr</i>	<i>Nr1i3</i>
Sijainti	Kromosomi 6q16	Kromosomi 13q24
Eksonit	11	9
Koko(mRNA)	2574 bp	1625 bp
Yhteenveto	Ligandiaktivoituva transkriptiotekijä, joka aktivoi mm. vierasaineita metaboloivien geenien säätely-yksikköä ksenobioottisessa stressissä(erityisesti <i>Cyp1a1</i>).	Ligandiaktivoituva transkriptiotekijä, joka transaktivoi fenobarbitaali-lääkeaineen kaltaisia yhdisteitä metaboloivien geenien säätely-yksikköä (mm. <i>Cyp2b1</i>).

3 RT-qPCR

RT-qPCR on RNA-näytteen reaaliaikainen kvantitatiivinen polymeraasiketjureaktio (Reverse Transcriptase Quantitative Polymerase Chain Reaction). Metodia käytetään analysoimaan nukleinihapposekvenssejä geeniekspressioanalyysissä ja kvantitoidessa geenejä. Polymeraasiketjureaktiosta saadaan reaaliaikaista numeerista dataa spektrofotometrisesti fluoresoivilla markkereilla tai DNA-koettimilla. Opinnäytetyön RT-qPCR-tekniikassa vaatimuksena on, että analysoitava nukleinihapposekvenssi on käännetty komplementaariseksi DNA:ksi (cDNA) käänteiskopioijaentsyymireaktiolla (RT/reverse transcriptase). [22, s.35.] Reaaliaikaisesta PCR-tekniikasta käytetään tässä työssä RT-qPCR- lyhennettä, kun puhutaan käytetyn menetelmän kokonaisuudesta, ja qPCR-lyhennettä tekniikan teoriaosuudessa sekaannusten välttämiseksi käänteistranskriptaasin kanssa (RT).

Perinteinen PCR on kvalitatiivinen polymeraasiketjureaktio, joka perustuu sarjaan lämpötilanvaihtumisia, jotka mahdollistavat syklin, jonka aikana monistettavaa tuotetta syntyy ideaalitilanteessa eksponentiaalisesti. PCR:n materiavaatimuksena ovat templaatti-DNA, alukkeet, nukleotidit ja entsyymit. Reaktion ensimmäisessä vaiheessa, denaturaatiossa, DNA:n kaksoiskierrekas rakenne hajoaa n. 95 °C:ssa. Toisessa vaiheessa, annealimisessa, lämpötilaa lasketaan tyypillisesti alukkeille optimiin (alle 70 °C) lämpötilaan, jolloin

alukkeet sitoutuvat DNA-templaattiin. Spesifiset alukkeet rajaavat monistettavan DNA:n alueen sitoutumalla tunnistettavaan kohdegeeniin. Reaktion kolmannessa vaiheessa, ekstensiassa, lämpötilaa nostetaan 72 °C:een, jolloin DNA-polymeraasientsyymi valmistaa alukkeiden rajaaman alueen DNA-templaatin emäsjärjestyksen mukaisesti. [22, s. 36.] Tyypillinen PCR-ohjelma, joka soveltuu myös qPCR:ään, on esitetty taulukossa 7.

Perinteinen PCR-analyysi kertoo yhdistettynä agarosigeelielektroforeesin (AGE) kanssa lopullisen muodostuneen tuotteen laadun, mutta ei kvantitoida DNA:n määrää tarkasti ja on dynaamiselta alueeltaan melko suppea (vrt. qPCR). PCR perustuu templaatti-DNA:n läsnäoloon ja mahdolliset muodostuneet lopputuotteet määritetään agarosigeelissä. Geelissä näkyvää signaalia eli vyöhykettä verrataan standardeihin. PCR-tuotteen analysointi AGE:lla antaa mahdollisuuden monistaa pitkiäkin amplikoneja (>10 000 bp), mikä on hyödyllistä DNA:n jatkokäsittelyn ja kloonauksen kannalta. [23, s.11.]

3.1 qPCR-tekniikka

Kvantitatiivisessa PCR (qPCR) analyysissä käytetään kaksijuosteiseen DNA:han sitoutuvia fluoresoivia markkereita tai sekvenssispesifisiä DNA-koettimia, jotka mahdollistavat tuotteen määrän seuraamisen reaktion aikana. Analyysi perustuu fluoresenssin mittaamiseen jokaisen syklin aikana reaaliaikaisesti. Syklin logaritmisessa vaiheessa fluoresenssin määrä kasvaa lineaarisesti suhteessa monistuvan tuotteen määrään. Logaritminen vaihe alkaa sitä aikaisemmin, mitä enemmän templaatti-DNA:ta on lähtöhetkellä. Täten qPCR:ssä määritetään jokaisen reaktion log-vaiheen alkamispiste (Ct/Quantification cycle) lopputuotteiden sijasta. Lämpötilaohjelman alkudenaturaatio ehkäisee alhaisissa lämpötiloissa synteesiä epäspesifisesti pariutuneista alukkeista ja alukkeiden sitoutumista toisiinsa eli ns. primer-dimer-tuotteiden syntymistä, mikä parantaa qPCR:n tehokkuutta. [24, s.2 -3.]

Alukkeiden on oltava spesifisiä ja termodynaamisesti yhtenäisiä kohdesekvenssin kanssa sekä kooltaan 18- 25 bp pitkiä. Erityisesti sitoutumisen on oltava tehokasta polymeraasin aloituskohdassa alukkeen 3`-päästä, jolloin alukkeen on oltava täysin komplementaarinen templaatile 5-6 bp osalta. Alukkeen sulamislämpötilaan (T_m) vaikuttaa erityisesti GC-nukleotidien määrä ja kokonaispituus (bp). Alukkeiden GC-suhteen olisi hyvä olla 40–60 % ja sulamislämpötilan (T_m) 55–60 °C. [23, s. 28.]

Reaaliaikaista numeerista dataa saadaan laajalla dynaamisella alueella ($1 - 10^9$) qPCR-tekniikassa. qPCR-analyysillä on suuri herkkyys, mikä asettaa vaatimuksia näytteenkäsittelyyn ja rinnakkaisnäytteiden määrään verrattuna kvalitatiiviseen PCR:ään. Herkkyydellä tarkoitetaan menetelmän kykyä havaita näytepitoisuuksien pienet vaihtelut. Täten qPCR:ssä näytteet, negatiiviset kontrollit ja standardit analysoidaan tyypillisesti rinnakkaisesti triplikaatteina tai duplikaatteina. [22, s.35.]

3.2 Normalisaatio

Tulokset normalisoidaan qPCR-tekniikassa, koska näytteissä ja standardeissa on absoluuttista virhettä esimerkiksi pipetointitarkkuuksissa, entsyymien ja reagenssien aktiivisuudessa sekä muuttuvia tekijöitä näytteiden kudoksissa, käytetyissä menetelmissä ja koeolosuhteissa. Normalisaatiolla korjataan yllämainittujen muuttujien aiheuttamaa virhettä, esimerkiksi laimentamalla näytteiden RNA samaan pitoisuuteen. Tosin virhettä aiheuttaa spektrofotometrinen mittaustekniikka, jossa näytteen puhtaus vaikuttaa absorbanssin (A_{260}) määrään, mistä RNA kvantitoidaan. [23, s. 39.]

Tulosten normalisointi voidaan qPCR-tekniikassa suorittaa joko absoluuttisena kvantitointina, jossa geenin kopia-luku määritetään, tai suhteellisen kvantitointina, jossa tutkitun geenin ilmentymistä verrataan toiseen geeniin, jota käytetään toisessa näytteessä referenssinä. Absoluuttisessa kvantitoinnissa käytetään ulkoista kalibrointikuvaajan suoria, jonka standardisuoran laimennoksissa on sellaisen näytteen DNA:ta, jossa oletetaan olevan korkeat pitoisuudet tutkittavaa DNA-sekvenssiä. Standardin amplikonin voi olla kloonattu tai syntetisoitu (DNA, RNA). Geeniekspressiotason määrittämisessä käytetään tyypillisesti RNA:sta käännettyä cDNA-standardia, jolloin RT-reaktioiden tehokkuus saadaan myös normalisoitua qPCR-tekniikassa. Tavallisimmin qPCR-standardi on konventionaalisella PCR:llä, samoja alukkeita kuin näytteiden qPCR-ajossa käyttäen, tuotettu kaksisäikeinen DNA-fragmentti. Optimaalisesti alukkeiden tulisi sijaita hieman kauempana 5'- ja 3'-suuntiin kuin varsinaisen qPCR-amplikonin alukkeet, jolloin standardia jossa monistus tapahtuisi alkuperäisen DNA-fragmentin sisältä, mutta yleensä tyydytään yhteen alukepariin, koska tämäkin menetelmä toimii valtaosassa tapauksia moitteettomasti. Standardeja monistetaan yhtenäisillä PCR-reaktioiden tehokkuudella kuin näytteiden tutkittavaa geeniä ja kvantitoinnissa on käytettävä samaa spektrofotometristä menetelmää kuin näytteiden RNA:n määrittämisessä ja ne on laimennettava vastaamaan

geeniekspression dynaamista aluetta (10^{-1} - 10^{-10}). [23, s.40 -41.] Standardit laimennetaan yleensä niiden DNA:ta stabilisoivaan laimentimeen, kuten esimerkiksi opinnäytetyössä käytetyn bakteriofagista eristettyyn MS2RNA:n (Roche). M2S-RNA:ta käytetään siksi, että nukleiinihapoilla on laimeina pitoisuuksina taipumus adsorboitua muoviputkien sisäpintoihin, jolloin liuoksen nukleiinihappopitoisuus voi laskea hyvinkin jyrkästi säilytyksen aikana. M2S-RNA ei myöskään häiritse qPCR-reaktioita. Standardit monistetaan yhdessä näytteiden kanssa samoilla qPCR-analyysin parametreilla. Näytteiden signaalit kvantitoidaan standardisuoralta sen raja-arvojen ja sensitiivisyyden rajoissa.

3.3 Kalibroitikuvaaja

Kalibroitikuvaajassa esitetään crossing point (Ct)-konsentraation funktiona qPCR-tekniikassa. Crossing point on sykli, jolla detektoitu fluoresenssin arvo ylittää taustan (threshold) qPCR-analyysissä. Suurempi aloitus-DNA-määrä monistuu taustan yllä välle tasolle pienempää aloitus-DNA-määrää nopeammin, myös sen crossing point on pienempi.

Kalibroitisuoran arvot kertovat PCR-tehokkuudesta, johon vaikuttavat pääasiassa reagenssien konsentraatiot, amplikonin pituus, amplikonin GC-nukleotidien määrä ja käytettyjen alukkeiden/probien/amplikonien sekundäärirakenteet. Tehokkuuteen vaikuttavat oleellisesti myös optimoidut koeolosuhteet ja menetelmät sekä laboratoriotyöskentely, kuten esimerkiksi pipetoinnin tarkkuus. PCR:n tehokkuus on 100 %, jos standardisuoran kulmakerroin on -3,32. Tällöin 10x-laimennoskertoimella kahden standardin Ct-arvojen erotus on 3,2. Jokaisen 3,2 syklin aikana signaalin voimakkuus kymmenkertaistuu. Hyväksyttävä PCR-tehokkuus analyysissä on luokkaa 90 % -110 %, joka kulmakertoimena tarkoittaa -3.1 – -3.58. [23, s.46.]

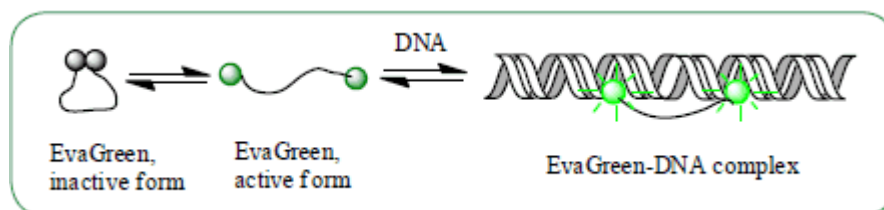
PCR-reaktion sensitiivisyyttä kalibroitisuoralla voidaan arvioida vertaamalla näyteduplikaatin ja standarditriplikaatin välisiä Ct-arvoja. Esimerkiksi analyysin sensitiivisyys on heikompaa, kun alhaisten pitoisuuksien standarditriplikaatin väliset Ct-arvot eroavat merkittävästi keskenään, jolloin standardisuora ei ole lineaarinen. Toistettavuutta arvioi-
dessa voidaan vertailla duplikaattien tai triplikaattien Ct-arvojen varianssia näytteillä. Opinnäytetyön qPCR-analyysissä raja-arvona voidaan pitää $Ct < 0,5$. Kalibroitisuoran laatua voidaan myös arvioida R^2 – parametrilla, joka kertoo, kuinka lineaarisesti data korreloittuu. PCR:n kalibroitisuoran arvioinnissa $R^2 < 0,95$ – arvolla voidaan olettaa, että

pipetoinnissa on ollut virhettä tai Ct:n ja kymmenkantaisen logaritmisen DNA-konsentraation välillä ei ollut lineaarista yhteyttä. $R^2 > 0,985$ – arvo on luotettava alaraja korrelaatiolle suoran lineaarisuudessa qPCR -tekniikassa. [23, s.47.]

3.4 EvaGreen-sovellus

Käytettävät fluoresoivat markkerit ovat joko alukkeiden kaltaisesti spesifisiä tai epäspesifisiä, jolloin ne pariutuvat valikoimatta kaksijuosteiseen DNA:han. Fluoresoivista epäspesifisistä markkereista EVAGreen-sovelluksessa fluoresenssi mitataan ekstensio-vaiheen aikana spektrofotometrisesti sille spesifisellä aallonpituudella ($\lambda_{\text{abs}}/\lambda_{\text{em}} = 500\text{nm}/530\text{nm}$). [12] EvaGreen sitoutuu kaikkeen kaksijuosteiseen DNA:han voimistaen fluoresenssia satakertaisesti. [10.] Tällöin fluoresoivat myös epäspesifiset tuotteet ja primer-dimer-tuotteet, jotka saadaan tunnistettua sulamiskäyräanalyyysillä. Toinen yleinen kaksijuosteiseen DNA:han kiinnittyvä fluoresoiva markkeri qPCR-tekniikassa on SYBR Green I, joka on toimintamekanismltaan EvaGreen väriaineen kaltainen.

Molemmilla väriaineilla on hyvin samankaltainen eksitaatio- ja emissiospektri, minkä ansiosta samoilla optisilla qPCR-parametreilla voidaan käyttää kyseiselle analyysille optimaalisempaa väriainetta. Verrattuna SYBR Green I -väriaineeseen EvaGreen on parempi ja tehokkaampi vaihtoehto. Se on todella stabiili ja aiheuttaa vähemmän PCR:n inhibitiota sekä epäspesifisien amplikonien syntymistä. Väriaineena EvaGreen ei ole mutageeninen tai sytotoksinen, eikä se läpäise solujen membraanikalvoja, toisin kuin SYBR Green I, joka on solukalvon läpäisevä ja mutageeninen. [10; 11.]



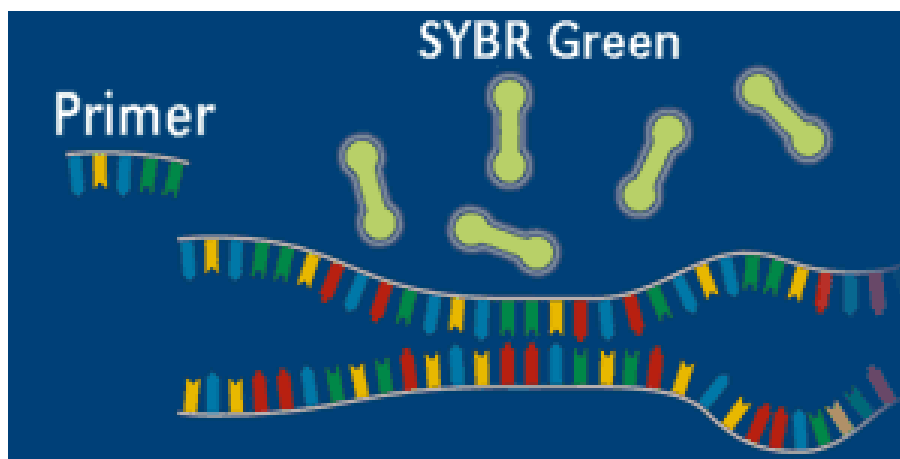
Kuva 4. EvaGreen väriaineen "release-on-demand"-mekanismi. [10.]

EvaGreen säilyttää dynaamisen tasapainon inaktiivisessa muodossa, jolloin se ei fluoresoi ollenkaan, kunnes kaksijuosteista DNA:ta on läsnä denaturaatiossa (kuva 4). Tällöin tasapaino siirtyy EvaGreenin aktiiviseen muotoon ja se kiinnittyy DNA:han fluoresoimaan. Tasapainomekanismi mahdollistaa väriaineen aktiivisen ja inaktiivisen määrän säätelyn,

kun DNA:n määrä lisääntyy sykleittäin qPCR:n edetessä. Mekanismin ansiosta väriainetta voi käyttää jopa ylenmäärin ilman väriaineen omaa fluoresaatiota. [10.]

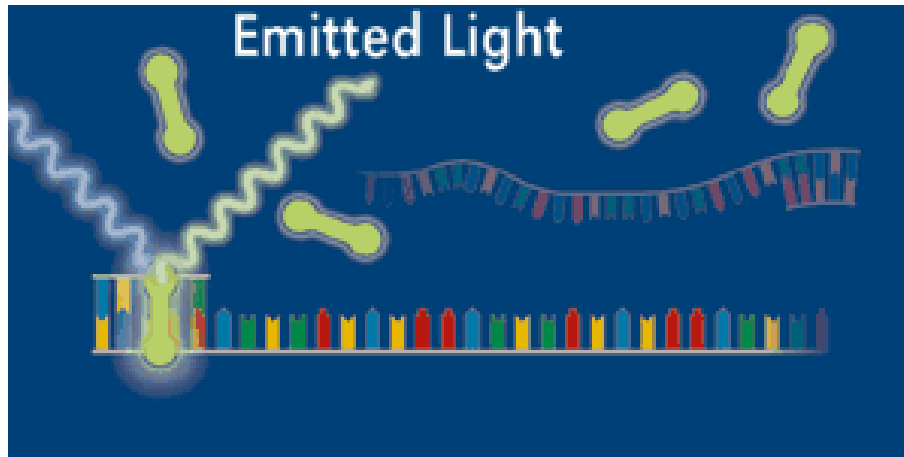
EVAGreen ja SYBR Green I -sovelluksiin on liitetty qPCR-analyysille tyypillinen sulamiskäyräanalyysi, jossa määritetään amplikonin sulamispiste (T_m). Sulamiskäyräanalyysissä ekstension ja fluoresenssin mittausvaiheiden syklien jälkeen lämpötilaa nostetaan asteittain, kunnes amplikonin denaturaation seurauksena havaitaan voimakas fluoresenssin lasku. Amplikonin olisi hyvä olla 80 -150 bp kokoinen. Lyhyillä amplikoneilla saavutetaan parempi qPCR-tehokkuus ja pidemmät amplikonit lisäävät signaalin voimakkuutta ja taustaa, koska fluoresoivia molekyylejä tarvitaan enemmän. [5, s.29.] Käytännössä laite laskee fluoresenssituloksista 1. asteen derivaatan ja amplikonin sulamispiste havaitaan sulamiskäyrän huipusta. Sulamiskäyräanalyysi korvaa perinteisen PCR:n agaroosigeelielektroforeesin tunnistamalla amplikonit. Amplikonin sulamislämpötilan (T_m) määrittäminen vastaa elektroforeesin erottaman vyöhykkeen koon tunnistamista. Amplikonin sulamislämpötilaa kasvattaa erityisesti korkea G+C-pitoisuus ja amplikonin suuri koko. Sulamiskäyrää käytetään myös protokollan optimointiin ja tuotteiden identifiointiin. [6, s.3.]

EVAGreen sovelluksen mekanismi on samanlainen kuin kaupalliselle SYBR Green 1 fluoresoivalle väriaineelle, jonka mekanismi on havainnollistettu kuvissa 5-7 qPCR-lämpötilaohjelman vaiheiden kautta.



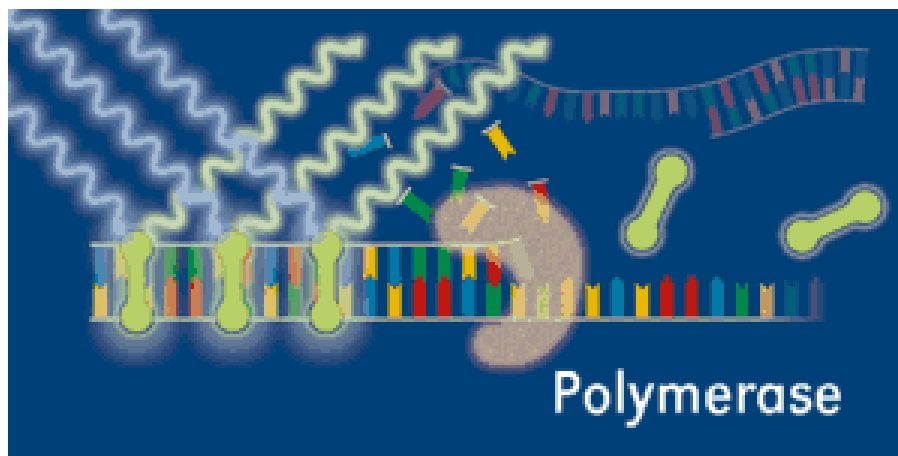
Kuva 5. SYBR Green I mekanismi: Denaturaatio. [9.]

Syklin denaturaatiovaiheessa reaktiossa on läsnä denaturoitunutta DNA:ta, primereita, vapaita nukleotideja ja fluoresoivaa väriainetta (kuva 5). SYBR Greenin emittoima fluoresenssi on vähäistä ilman sitoutumista kaksijuosteiseen DNA:han. Se nähdään taustakohinaa laitteen detektiossa. Passiivinen fluoresointi ennen denaturaatiota on SYBR Greeniä alhaisempaa EVAgreen väriaineella.



Kuva 6. SYBR Green I mekanismi: Annealing. [9.]

Annealing-vaiheessa, primerien sitoutuessa spesifisesti DNA-templaattiin, osa SYBR Green I -väriaineesta sitoutuu kaksijuosteiseen DNA:han. Sitoutuminen näkyy väriainemolekyylien emittoiman fluoresenssin kasvuna (Kuva 6).



Kuva 7. SYBR Green I mekanismi: Ekstensio. [9.]

Ekstension aikana yhä useampi SYBR Green I -molekyyli sitoutuu uuden DNA-polymeeraasin syntetisoiman DNA:n rakenteeseen. Fluoresointi kvantitoidaan reaaliajassa ekstension päätyttyä, kun SYBR Green I -molekyylien viritystila purkaantuu emissiossa (Kuva 7).

Fluoresenssi voidaan mitata joko ekstensiovaiheen aikana (tavallisesti 72 °C) tai erillisessä vaiheessa ekstension ja denaturaation välissä, jolloin voidaan usein mahdollisten virhetuotteiden vaikutus fluoresenssin määrään. Sen avulla voidaan kvantitoida syntyneen DNA-tuotteen määrää reaaliajassa. Uuden syklin denaturaatiossa väriainemolekyylit vapautuvat DNA:n rakenteesta, jolloin fluoresointisignaali tippuu. Yhdistettynä sulamiskäyräanalyysin kanssa EVAGreen-sovellus on hyödyllinen tekniikka syntyneen qPCR-tuotteen tunnistamisessa ja kvantitoinnissa. [9.]

4 Menetelmät ja materiaalit

Välineet ja reagenssit ovat taulukoituna: Laitteet [taulukko 3], Opinnäytetyön kitit [taulukko 4] ja Opinnäytetyössä käytetyt reagenssit [taulukko 5]. RT-qPCR-analyysissä käytetyt alukkeet ja Rotor-Gene-laite sekä alukkeet on käsitelty yksityiskohtaisemmin luvuisaan.

Taulukko 3. Laitteet

Laitteet	
Rotor-Gene	Corbett Research 3000; Software 6.0.31
Nanodrop	Thermo Scientific ND-1000c Spectrophotometer 3.8.1
Lämpöblokki	Labnet AccuBlok™ Digital Dry Batch
Homogenisaattori	Qiagen Tissue Lyser LT SN.23.1001 / 05637
Sentrifugi	Eppendorf 5415 R; 24-place Fixed-angle rotor for 1,5-2,0 ml tubes

Taulukko 4. Opinnäytetyön kitit

Kitit	
Sigma GenElute™ Mammalian Total RNA Miniprep Kit	RTN350-1KT
Ambion TURBO Dnase Treatment and Removal Agents	Ref. AM1907
Thermo Scientific O`RangeRuler 50 bp DNA Ladder	Ref. SM0613
Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit (50 preps.)	Cat.D4001
Qiagen HotStarTaq DNA Polymerase (250 U) kit	Cat.203203

Taulukko 5. Opinnäytetyössä käytetyt reagenssit

Reagenssit	
Seakem. LE Agarose	No.S0004; Lot#0000423381
8 ng/ml MS2RNA	Ref.10165948001; Lot#10719720
EtOH	Etax AA 99,5 % Altia Oy
MP Biomedicals EtBr	Cat.802511 / MR 31022
Oligomer Oligo-dT (100 µM)	141205F3B10 1/2; 323 µg; T _m =36,5; 56,5 nmol; 564 µl; 100 pmol/µl
Oligomer random primers (50 µM)	150211H4A01; 3/3; 361 µg T _m = -18,5; 201 nmol; 2014 µl; 100 pmol/µl
Nuclease free H ₂ O	Ambion RNase free water
Promega MMLV RT 5x Buffer	M531A, Lot#23713948
Thermo Fischer RiboLock RNase inhibitor (40 U/µl)	E00381 Lot#00233505
Thermo Fischer dNTP mix (10nM)	R0192 Lot#00150148
Promega M-MLV Reverse Transcriptase (200 U/µl)	Ref. M368C; Lot#0000097428
Solis BioDyne: 5 x HOT FIREPol EVAGreen qPCR Mix Plus	Ref. 08-25-0020; Lot#5xwrpe60640

4.1 Rotor-Gene 3000

Rotor-Gene on qPCR-laite, jolla voidaan reaaliajassa analysoida PCR:n nukleinihapposekvenssejä spektrofotometrisesti ja tunnistaa syntyneitä amplikoneja sulamiskäyrä-analyysillä. Laite pitää sisällään sentrifugin (500 rpm) ja tarvittaessa limitetyillä valon signaaleilla pystytään detektoimaan neljän eri probin fluoresoinnin signaali samanaikaisesti yhdestä näyteputkesta. Näytteet pyörivät sentrifugissa qPCR- ohjelman aikana, mikä parantaa lämpötilaohjelman tehokkuutta ja tarkkuutta. [24, s.16.]

Rotor-Gene soveltuu laajasti eri qPCR-sovelluksille sekä entsyymeille. Rotor-Gene-laitteen tekniset tiedot ovat taulukossa 6. ja analyyseissä käytetty kolmivaiheinen qPCR ajo-ohjelma on taulukossa 7. Fluoresenssin luku tapahtuu jokaisen 40 syklin aikana ekstension jälkeen. Analyysiaika ajo-ohjelman ja sulamiskäyräanalyysin protokollalle oli yhteensä 62 minuuttia. Sulamiskäyräanalyysissä lämpötila nousee tasaisesti ohjelman mukaan ja fluoresenssia mitataan koko ajan. Sulamislämpötila saadaan määritettyä, kun

amplikonin DNA:n kaksoiskierre ”sulaa” eli säikeet irtoavat toisistaan, jolloin fluoresenssi vähenee näytteessä.

Taulukko 6. Rotor-Gene-laitteen tekniset tiedot.

Tekniset tiedot	Corbett Research Rotor-Gene 3000
Software	6.0.31
koko	380 cm x 480 cm x 315 cm
paino	17 kg
Lämpötila-alue	25 -99 °C
Lämmitysnopeus	2,5 °C /s (putki)
	5,0 °C /s (ilma)
Lämmitystarkkuus	0,5 °C
Kaivot	36 x 200 µl roottori (micro tubes) 72 x 100 µl roottori (strip tubes)
Fluoresointisovellukset	Sybr-green I, Fam, Tet, Joe, Vic, Max Rox, Tamra, Cy3, Cy5, Cy5.5, Tex Red
Eksitaatioaallonpituus	470nm, 530nm, 585nm, 625nm
Detektiosuodatus	510nm, 555nm, 610nm bandpass 660nm, 580nm, 610nm high-pass

Taulukko 7. Kolmivaiheinen qPCR-protokolla ja sulamiskäyräanalyysi.

Protokolla			
Sykli	lämpötila	aika	sykliä määrä
Alkudenaturaatio	95 °C	15 min	1x
Denaturaatio	95 °C	15 s	40x
Annealing	60 °C	20 s	
Ekstensio	72 °C	20 s	
Fluoresenssisignaalin mittaus	78 °C	15 s	
Sulamiskäyräanalyysi	(60 °C - 98 °C)		1x

4.2 Alukkeet

Alukkeet tilattiin Oligomer-laboratoriosta. Molempien alukeparien sekvenssit ja amplikonit ovat taulukossa 8 sekä GC- % ja sulamislämpötilat taulukossa 9.

Taulukko 8. *Cyp1a1* ja *2b1*-alukkeiden sekvenssit ja amplikonit.

Aluke	Forward primer-5`	Reverse-primer-3`	Amplikoni(bp)
<i>Cyp1a1</i>	5`-gtcaggacaggaggctggac-3`	5`-gattgtgtcaaaccagctc-3`	101
<i>Cyp2b1</i>	5`-ttgaccaccagacagcttc-3`	5`-acaaatgcgcttcctgtgg-3`	104

Taulukko 9. *Cyp1a1* ja *2b1* GC- % ja sulamislämpötilat.

Aluke	GC (%)	Tm(°C)
<i>Cyp1a1 F</i>	65	63,5
<i>Cyp1a1 R</i>	50	57,3
<i>Cyp2b1 F</i>	55	59,4
<i>Cyp2b1 R</i>	50	57,3

4.3 Koeasetelma

Kokeessa, josta opinnäytetyössä käytetyt näytteet olivat peräisin, annosteltiin rotille AHR-agonistia (C2) sekä CAR-agonisti TPD:tä, jonka vaikutukset eivät välity ollenkaan AHR:n kautta. Kumpikin aine aktivoi maksan vierasaineita metaboloivia entsyymeitä, TPD erityisesti CYP2B1:tä CAR reseptorin välityksellä ja C2 CYP1A1:tä AHR:n välityksellä. Lisäksi tutkittiin, vaikuttaako AHR-antagonisti (CH-223191) aversion muodostumiseen ja metaboliaentsyymien aktivaatioon. Opinnäytetyössä tarkastellaan, löytyykö aversion ja mahalaukun metaboliaentsyymien geeniekspressiotason väliltä yhteyttä.

Opinnäytetyön materiaalina olleet rotan mahalaukunäytteet olivat valmiiksi kerättyjä ja säilytetty - 80 °C pakastimessa kudospalojen leikkausta, RNA-eristystä, RT-reaktioita ja qPCR-analyysiä varten. Rottien mahalaukunäytteet ja materiaalit on esitetty liitteessä 1.

4.4 Kudospalojen leikkaaminen

Rottien mahalaukkunäytteitä oli yhteensä 55 ja ne jaettiin ryhmiin K1, K2, K3 ja K4. Ryhmät koostuvat erilaisista annostelu- ja kontrolliryhmistä. Rotista leikatut mahalaukun kudokset säilytettiin – 80 °C:ssa. Kudokset pidettiin jäisinä koko säilytyksen ja käsittelyn ajan, jotta RNA ei tuhoutuisi. Leikkaus tapahtui laboratorion työpöydällä, joka puhdistettiin teknisellä alkoholilla ja kuivajäätä järjestettiin työtaso, jossa näytteet säilyivät jäisinä koko leikkauksen ajan. Kudoksista leikattiin leikkurilla ja pinseteillä n. 40 mg:n kokoiset palat kuivajäiden päällä. Kudospalat siirrettiin esijäädetyihin 2 ml:n eppendorf-putkiin metallisen kuulan kanssa. RNA-eristystä varten leikatut kudospalat varastoitiin – 80 °C.

4.5 RNA-eristys

RNA-eristys suoritettiin kaupallisen SigmaGenElute™ Mammalian Total RNA Miniprep Kitin ohjeen mukaisesti. Sigman kitti soveltuu nisäkässolujen ja kudosten totaali-RNA:n eristämiseen. Kitissä on kuvattuna protokollat erikseen nisäkässoluille, kudoksille ja säikeisille kudoksille. Protokollat eroavat toisistaan solun ja kudosten erilaisten lyaatinvalmistusolosuhteiden mukaan, mutta ovat yhtenäisiä puhdistus- ja eristysprotokollasta (Procedure D. RNA Isolation) eteenpäin RNA:n kiinnittyä eristyskolonniin. Opinnäytetyössä kudosten leikkaaminen ja RNA-eristys suoritettiin rotan mahalaukun kudoksille (Procedure B. Fresh, Frozen, and RNA/*later* Stabilized Mammalian Tissue Preparation).

Kitin protokolla perustuu silika-pohjaiseen RNA:n eristyskolonniin, jolloin eristyksessä ei tarvita cesiumkloridigradienttia, alkoholisaostamista tai haitallisia orgaanisia yhdisteitä, kuten fenoleita tai kloroformia. Kudosten lyysis-puskuriliuksessa on guanidiini-tiosyanaatti-yhdistettä, joka denaturoi näytteen makromolekyylit ja inaktivoi RNAaseja. RNA kiinnittyy RNA:n eristyskolonnin silikakalvoon, kun eristysprotokollassa lisätään mikrosentrifuugiputkiin etanolia.

Esivalmisteluina RNA-laboratorion vetokaappi ja laminaari käsiteltiin 3 % -deconex:lla ja 70 % -etyylialkoholilla. RNA-laboratoriossa käytettiin sille varattuja laboratoriovarusteita, kuten takkia ja hanskoja, ja tila oli eristetty muista laboratorioista. Laboratorion laitteet, sentrifugi ja lämpöblokki olivat vastaavasti käsiteltyjä ja eristyksessä tarvittavat koeputket, pipetit ja pipetin kärjet olivat puhtaita RNAaseista. Valmisteluilla pyrittiin minimoi-

maan RNAasien ja DNA:n kontaminaatioiden riskit, jotka saattaisivat vaikuttaa RNA-eristuksen laadulliseen ja määrälliseen onnistumiseen. RNA-eristyksessä näytteet jaettiin 12 kudospalan ryhmiin ja säilytettiin kuivajäillä. Eristys suoritettiin erillisessä RNA-laboratoriossa. RNA-eristystä varten valmistettiin 50 ml 70 % etyylialkoholia ja sentrifugin lämpötila säädettiin 20 °C.

RNA:n irrottamiseen solumatriisista valmistettiin 1 % 2-ME/lyysis -puskuria 500 µl/näyte. Pipetoitiin 6,5 ml lyysispuskuria ja 65 µl 2-merkaptotaetanolia, jonka jälkeen näytteet asetettiin kuivajäiltä koeputkissa homogenisaattorin näytepaikoille. Kyseinen vaihe oli nopeuden suhteen kriittinen, ettei RNA ehtinyt hajota. Kudospalat eivät saaneet sulaa tai lämmetä merkittävästi ennen homogenisointia, jolloin RNA vasta irtaantui solumatriisista ja mahdolliset RNAasit inaktivoituivat. Kuhunkin näytteeseen pipetoitiin 500 µl lyysispuskuria ja tämän jälkeen suoritettiin välittömästi 2 x 2 min homogenisointi Qiagen Tissue Lyser LT -laitteella, missä metallikuula homogenisoi kudospalan puskuriin mekaanisesti tärinässä.

Homogenisoinnin jälkeen lysaatti siirrettiin uuteen 2 ml:n suodatuskolonniputkeen ja sentrifugointiin 30 s 15600 g, jossa DNA pilkkoontui ja ylimääräinen soluaines poistui. Suodattuneeseen lysaattiin lisättiin 500 µl 70 % etyylialkoholia, jonka jälkeen se kevyesti vorteksointiin.

RNA eristettiin lysaatista kaksivaiheisesti. RNA:n annettiin kiinnittyä kiinnityskolonniputkeen, jossa sitä pestiin ja josta se eluoitiin RNA-eristyskitin [Taulukko 4] ohjeiden mukaan. Puhdistettu RNA siirrettiin 0,5 ml:n eppendorf putkeen jälle DNAasikäsittelyä varten. RT-qPCR-tekniikassa mahdolliset DNA-kontaminaatiot poistettiin eristetystä RNA:sta DNAasikäsittelyllä ennen kääntöreaktioita ja analysointia.

4.6 DNAasikäsittely

Rotan mahalaukuista eristetylle totaali-RNA:lle suoritettiin DNAasikäsittely Ambion TURBO Dnase Treatment and Removal Agents Kitin ohjeen mukaisesti. Käsittelyn tarkoituksena oli poistaa näytteistä DNA-jäänteet, jotta analysoitava RNA olisi mahdollisimman puhdasta laimennoksia ja RT-reaktioita varten.

Kitin turbo-DNAasi-digestioreagenssi on muokattu tehokkaammaksi tavallisesta DNAasi I entsyymistä. DNAasi-reagenssin poistaminen käsitellystä näytteestä ei vaadi kitissä fenoli/kloroformiuuttamista, alkoholisaostamista, kuumennusta tai EDTA:n lisäämistä. DNAasi-inaktivaatioreagenssi poistaa myös Mg^{2+} ja Ca^{2+} kationeja, jotka voivat katalysoida RNA:n hajoamista, kun näytettä kuumennetaan.

Ennen DNAasikäsitelyä suoritettiin vastaava esivalmistelu RNA-laboratoriossa kuin RNA:ta eristäessä. Lämpöblokki esilämmitettiin 37 °C:een. Puhdistettuun RNA:han pipetoitiin 5 µl 10x Dnase puskuria, 1 µl TURBO Dnase -entsyymiä ja inkuboitiin lämpöblokkissa 20 min 37 °C. Inkubaation jälkeen pipetoitiin 10 µl DNase Inactivation -reagenssia ja seosta inkuboitiin 5 min huoneenlämmössä välillä sekoittaen. Inkubaation jälkeen sentrifugoitiin 1 min 9000 g ja ylemmää RNA-faasia otettiin talteen 50 µl 0,2 ml eppendorf-putkeen jälle RNA-pitoisuuden mittaukseen saakka.

RNA-pitoisuuden määrittäminen

Pitoisuudet mitattiin Nanodrop- spektrofotometrillä ja näytteen puhtausvaatimuksena pidettiin absorbanssien (A_{260}/A_{280}) suhdelukujen arvot väliltä 1,8–2,1. Opinnäytetyössä RNA:n pitoisuusvaatimuksena oli 200 ng/µl. Puhdistettu ja käsitelty RNA varastoitettiin –80 °C.

4.7 cDNA-synteesi

Puhdistetulle rotan mahalaukkujen totaali-RNA:lle suoritettiin käänteistranskriptaasi (RT) reaktiot Promegaan M-MLV H-point mutant reverse transcriptase -entsyymillä. Reaktiossa eristetty totaali-RNA käännettiin cDNA:ksi (komplementaarinen DNA) käänteiskopioija-entsyymillä. Käänteistranskriptaasit ovat retroviruksista tunnistettuja RNA:han kohdistuneita DNA-polymeraaseja, jotka syntetisoivat solussa DNA:sta transkriptoidusta mRNA:sta takaisin DNA:ta. Tällöin nukleotidisekvenssistä puuttuvat silmukoinnissa poistetut intronijaksot, jolloin syntetisoidussa DNA:ssa on jäljellä vain eksonijaksot, mistä juontaa nimitys komplementaarinen DNA (cDNA). Ideaaltilanteessa käänteistranskriptaasilla käsitellyn näytteen kaikki RNA kääntyy cDNA:ksi, riippumatta RNA:n runsaudesta, pituudesta tai sekundäärisistä rakenteista.

Kääntöreaktiot suoritettiin kolmessa sarjassa: K1 (18 näytettä), K2 sekä K3 (24 näytettä) ja K4 (13 näytettä). Kääntöreaktioita varten suoritettiin vastaava esivalmistelu RNA-laboratoriossa kuin RNA:ta eristäessä. Lämpöblokki esilämmitettiin 72 °C:een. RNA laimennettiin laminaarissa 200 ng/μl pitoisuuteen RNAasi-vapaaseen veteen ja 20 μl tilavuuteen. Laimennos suspensoitiin ja säilytettiin Denaturaatio-reaktioihin saakka 0,2 ml:n eppendorf putkissa jäiden päällä laminaarissa. RNA-näytteiden laimennokset on esitetty Liitteessä 2. Valmistettiin denaturaatio-reaktioseos vastaamaan 110 % näytemäärää. Denaturaatio-reaktiosekset valmistettiin taulukon 10 mukaisesti.

Taulukko 10. Denaturaatio-reaktiot

Denaturaatio-reaktiot:	(μl) x 1
RNA (totaali: 200 ng/μl)	4,0
Master Mix:	
Oligo-dT (50 μM)	0,5
Random primers (50 μM)	5,0
RNAasi-vapaa vesi*	5,5
Oligojen kokonaistilavuus (μl)	11,0
* "Nuclease free" H ₂ O	

Denaturaatioreaktiossa pipetoitiin 11 μl Master Mix -seosta ja 4 μl näyte RNA:ta (200 ng/μl), jonka jälkeen putket pikaisesti vorteksointiin ja reaktioseos sentrifugointiin putken pohjalle. RNA-reaktioseosta inkuboitiin 5 minuuttia 70 °C, jonka jälkeen putket siirrettiin välittömästi jäille laminaariin ja annettiin seistä 1 minuutin ajan. Valmistettiin RT-reaktioseos (reverse transcriptase) vastaamaan 110 % näytemäärä [Taulukko 11.]

Taulukko 11. RT-reaktioseos

RT-reaktioseos:	(μl) x 1
RNAasi-vapaa vesi	2,60
MMLV RT 5x Buffer	5
RiboLock RNase inhibitor (40 U/μl)	0,6
dNTP	1,30
Promegan M-MLV Reverse Transcriptase (200 U/μl)	0,50
RT-reaktioseos kokonaistilavuus (μl)	25

RT-reaktioseosta pipetoitiin 10 µl denaturoituun RNA-reaktioseokseen, jonka jälkeen lopulliseksi reaktiutilavuudeksi muodostui 25 µl. Putket vorteksointiin ja reaktioseos sentrifugointiin putken pohjalle. PCR-lämpötilaohjelma on esitetty taulukossa 12.

Taulukko 12. RT-lämpötilaohjelma

lämpötilaohjelma	lämpötila	aika	syklien määrä
Huoneenlämpö	22 °C	10 min	1x
RT-reaktio	50 °C	60 min	
Jäähdytys	4 °C	∞	

Syntetisoitu cDNA oli pitoisuudeltaan 32 ng/µl, joten tehtiin 6,4 x laimennos pitoisuuteen 5 ng/µl. Pipetoitiin 10 µl cDNA:ta ja 54 µl steriiliä vettä 0,2 ml:n eppendorf-putkeen ja cDNA-laimennokset säilytettiin laboratorion – 20 °C pakastimessa qPCR-reaktioita varten.

4.8 RT-qPCR (*Cyp1a1*, *Cyp2b1*)

4.8.1 Standardien synteesi

qPCR-standardit valmistettiin sellaisen näytteen cDNA:lla, jossa oletettiin olevan korkeat pitoisuudet tutkittavaa DNA-sekvenssiä. Näytettä monistettiin PCR:llä ja saadut PCR-tuotteet eroteltiin agarosigeelillä, josta haluttu tuote saatiin eristettyä ja puhdistettua.

PCR-reaktioihin pipetoitiin reagenssit optimoidun ohjeen mukaisesti ja tuotetta monistettiin 50 µl:n reaktion verran. Työohje perustui Qiagen HotStarTaq DNA Polymerase -kitiin. PCR:ään valittiin Qiagen Hot Star- entsyymi ja käytetyn kitin 10x Buffer ja dNTP-reagenssit. Molemmat alukkeet laimennettiin 5 µM:n pitoisuuteen. Taulukossa 13 on esitetty qPCR-standardien PCR-reaktiot ja taulukossa 14. on esitetty qPCR-standardien lämpötilaohjelma.

Taulukko 13. qPCR-standardien PCR- reaktiot

PCR-reaktio	μl
dH ₂ O	30,5
10 x Buffer (HotStar)	5
dNTP (10 μM)	1
Primer F (5 μM)	5
Primer R (5 μM)	5
HotstarTaq DNA Polymerase	0,5
Templaatti cDNA (5 ng/ μl)	3
Kokonaistilavuus(μl)	50

Taulukko 14. qPCR-standardien PCR-reaktion lämpötilaohjelma

Lämpötilaohjelma			
Sykli	lämpötila	aika	syklien määrä
Alkudenaturaatio	95 °C	15 min	1x
Denaturaatio	94 °C	25 s	35x
Annealing	60 °C	30 s	
Ekstensio	72 °C	30 s	
loppuekstensio	72 °C	10 min	1x
Jäähdytys	4 °C	∞	

Standardien PCR-tuotteet säilytettiin - 20 °C pakkasessa agarosigeelielektroforeesi ajoa ja eristystä varten.

Agarosigeelielektroforeesilla (AGE) tunnistetaan PCR-tuotteet ajamalla negatiivisesti varautuneet DNA-fragmentit sähkökentässä kohti positiivista anodia agarosigeelissä. Erottuminen perustuu DNA-fragmenttien kokoon, jonka perusteella päätetään agarosiprocentti ja värjäysmenetelmä. Geelin valmistuksessa käytettiin etidiumbromidi (EtBr) -värjäystä, joka värjäs näytteen nukleiinihapot ja mahdollisti DNA-vyöhykkeiden tarkastelun UV-valossa. EtBr on mutageeninen yhdiste, joten sitä käsiteltiin laminaarissa ja kaikki geelit ja välineet (pipetit ja hanskat) sitä käsiteltäessä kerättiin ongelmajätteenä DNA-laboratoriossa.

Valmistettiin kaksi 0,8 %:n LE-agarosigeeliä, joiden värjäyksessä käytettiin etidiumbromidia 0,5 µg/ml. AGE:en valittiin Thermo Scientific O`RangeRuler 50 bp DNA Ladder, reasy-to-use kitin 50 bp markkeri ja 6x puskuri (Orange DNA Loading Dye 6x), koska alukkeiden rajaamat PCR tuotteet olivat kooltaan 101 bp (*Cyp1a1*) ja 104 bp (*Cyp2b1*).

Kuvausgeelille pipetoitiin 10 µl näytettä + 2 µl 6x puskuria ja eristysgeelille 40 µl näytettä + 8 µl 6x puskuria. Standardeiksi pipetoitiin 10 µl 50 bp markeria. PCR -tuotteet ajettiin kahdella 0,8 % agarosigeelillä 300 mA, 100 V jännitteellä 20 minuutin ajan. Haluttu tuote eristettiin ja puhdistettiin standardisuoran valmistusta varten. Kuvausgeeliä tarkasteltiin Alpha Digidoc -kameralla (kuva 8).



Kuva 8. *Cyp1a1* ja *cyp2b1* PCR-tuotteet agarosigeelillä Alpha Digidoc -kameralla. Etidiumbromidi leimattu geeli on valaistu UV-valossa, jossa nähdään 50 bp markkeri ja näyte vyöhykkeet. Kuvasta nähdään, että epäspesifisiä PCR-tuotteita ei syntynyt ja erottuneet vyöhykkeet ovat oikeankokoista standardi kaksisäikeistä DNA:ta. Markkerit eivät onnistuneet tuotteiden koon vertailun kannalta. Agarosigeeli oli liian laimeaa (0,8 %). Sopivampi pitoisuus agarosigeelissä olisi luultavasti ollut 2 %.

Valmistettujen qPCR-standardien puhdistus ja konsentrointi suoritettiin Zymo Research Gel DNA Recovery Kitin mukaisesti. Kitin ADP (Agarose dissolving buffer) -reagenssi liuottaa leikatun geelin näytevyöhykkeen puskuriliuokseen lämmityksessä, josta näyte cDNA saadaan erotettua lysaatista eristyskolonnilla. Protokolla puhdistaa näytteestä agarosigeelin ja etidiumbromidin sekä konsentroi näytteen haluttuun pitoisuuteen DNA:n eluutio-puskuriliuosta (>6 µl) tai dH₂O:ta.

Eristysgeeliltä leikattiin kirurginveitsellä *cyp1a1* (m= 250 mg) ja *cyp2b1* (m=240 mg) UV-valossa erottuneet vyöhykkeet puhdistusta varten. Leikatut vyöhykkeet siirrettiin omiin 1,5 ml:n keräysputkiin, jonne pipetoitiin 750 µl ADP-reagenssia. Putkia inkuboitiin 50 °C:ssa 10 minuutin ajan. Agaroosigeeli liukeni ADP-reagenssiin, jonka jälkeen se siirrettiin pipetoimalla erotuskolonneihin, johon cDNA sitoutuu. Kolonnia sentrifugointiin 5700 x g 30 s ajan, jonka jälkeen läpivalunut lysaatti hävitettiin. Tuotteiden cDNA oli kiinnittyneenä kolonneihin, jolle suorettiin kaksivaiheinen pesuprotokolla. Kolonniputkeen pipetoitiin 200 µl Dna Wash Buffer -reagenssia ja sentrifugointiin 5700 x g 30 s ajan. Läpivalunut pesuliuos hävitettiin ja suoritettiin vastaava pesu uudemman kerran. Pesty erotuskolonne siirrettiin uuteen keräysputkeen eluointia varten. Kitin ohjeesta poiketen cDNA eluointiin 12 µl:aan dH₂O ja sentrifugointiin 15100 x g 1 min ajan. Puhdistetut cDNA:t eluointiin pienempään tilavuuteen, koska konsentroituneemmasta liuoksesta oli kätevää laimentaa tarvittavat korkeat konsentraatiot.

Eluoidut cDNA:t siirrettiin 0,2 ml:n eppendorf -putkiin ja pidettiin jäällä. Eristettyjen ja puhdistettujen qPCR -standardien pitoisuudet mitattiin Nanodrop-spektrofotometrillä. Tuotteiden laatua arvioitiin samoilla puhtausvaatimuksilla kuin eristetyillä RNA-näytteillä. Pitoisuuksiksi saatiin $c(\text{Cyp1a1})=25,39 \text{ ng/}\mu\text{l}$ ja $c(\text{Cyp2b1})=25,64 \text{ ng/}\mu\text{l}$. Standardit laimennettiin pitoisuuteen 5 ng/µl, jolloin laimennoskerroin oli 5x. Pipetoitiin 10 µl tuotetta + 40 µl dH₂O 0,2 ml:n eppendorf-putkiin. Standardi cDNA:t säilytettiin DNA-laboratorion -20 °C pakastimessa, josta niitä ei enää tuotu esikäsittely laboratorion puolelle kontaminaation riskin vuoksi.

Laimennoksessa käytettiin laimentimena ja standardien normalisaatioon 8 ng/ml MS2RNA:ta (Roche), koska se estää laimean DNA-liuoksen konsentraation muuttumisen muoviadsorption seurauksena. MS2RNA on bakteriofagi MS2:n eristettyä RNA:ta. Seuraavaksi tehtiin standardisuoran laimennokset. Molemmista 5 ng/µl standardin stoikeista valmistettiin seuraava laimennossarja [taulukko 15].

Taulukko 15. qPCR-standardien laimennossarja

Standardi	Laimennos
10^0	5 ng/ μ l
10^{-1}	10 μ l+90 μ l
10^{-2}	10 μ l+90 μ l
10^{-3}	10 μ l+90 μ l
10^{-4}	10 μ l+90 μ l
10^{-5}	10 μ l+90 μ l
10^{-6}	10 μ l+90 μ l
10^{-7}	10 μ l+90 μ l
10^{-8}	10 μ l+90 μ l
10^{-9}	10 μ l+90 μ l
10^{-10}	10 μ l+90 μ l

Laimennossarjaa valmistettaessa edellistä laimennosta pipetoitiin 10 μ l uuteen 0,5 ml:n eppendorf -putkeen, johon pipetoitiin laimentimena 90 μ l 8 ng/ml MS2RNA:ta. Standardisuoran laimennoksia säilytettiin DNA laboratoriossa – 20 °C pakkasessa.

4.8.2 qPCR–reaktiot

qPCR-reaktiot perustuivat Solis BioDyne: 5x Hot FIREPol EvaGreen qPCR Mix Plus kit:iin ja optimoituun qPCR-ohjeeseen. Työskentely tapahtui kahdessa eri laboratoriossa eri välineillä. qPCR-reaktioiden mastermix ja näytteet valmistettiin ja käsiteltiin esikäsittely-laboratoriossa ja standardien kanssa työskenneltiin vain DNA-laboratoriossa. Molemmissa laboratorioissa työskenneltiin laminaarissa ja työskentely jaettiin kahden laboratorion välille, koska kontaminaatoriski standardien ja näytteiden sekä reagenssien välillä haluttiin minimoida.

Molemmat laminaarit puhdistettiin 70 % -EtOH ja 3 % -deconex -liuoksilla. Ilmankierto laminaarissa asetettiin täydelle teholle 15 minuutin ajaksi ennen työskentelyn aloittamista. Tarvittavat pipetit, kärjet, kylmäblokit, reagenssit ja näytteet otettiin esille esikäsittely-laboratorion laminaariin ja standardit otettiin sulamaan jäähäuteeseen DNA-laboratorioon. Standardisuorassa standardit 10^{-11} - 10^{-7} olivat triplikaatteina ja 10^{-6} - 10^{-4} olivat duplikaatteina. Negatiiviset kontrollit (H_2O) olivat duplikaatteina. Valmistettiin mastermix vastaamaan standardien määrää + 10 %. [taulukko 16]

Taulukko 16. qPCR-reaktioiden Master Mix

Master Mix	1x (μl)
H ₂ O PCR grade	8
Primer F (5 μM)	2
Primer R (5 μM)	2
5x HOT FIREpol EvaGreen qPCR mix Plus	4
Yhteensä(μl)	16

Pipetoitiin aluksi negatiiviset H₂O-kontrollit: 16 μl/putki MM + 4 μl H₂O. Tämän jälkeen pipetoitiin standardeihin 16 μl MM-seosta, jonka jälkeen siirryttiin työskentelemään DNA-laboratorioon pipetoimaan 4 μl standardia/putki. 100 μl putket suljettiin mahdollisimman pian pipetoinnin jälkeen, kun 4 putken strippi tuli täyteen. Stripit siirrettiin Rotor-Gene-laitteen roottoriin ja käynnistettiin ajo. Ajon lämpötilaohjelma ja sulamiskäyräanalyysi ovat taulukoituna. [taulukko 17] Standardisuorat ajettiin erikseen molemmille *cyp1a1*- ja *2b1*-standardeille.

Taulukko 17. qPCR-reaktion lämpötilaohjelma

Lämpötilaohjelma			
Sykli	lämpötila	aika	syklien määrä
Alkudenaturaatio	95 °C	15 min	1x
Denaturaatio	95 °C	15 s	40x
Annealing	60 °C	30 s	
Ekstensio	72 °C	30 s	
loppuekstensio	78 °C	15 s	
Sulamiskäyräanalyysi	(60 °C - 98 °C)		1x

Näyteajoissa standardit 10^{-10} - 10^{-7} olivat triplikaatteina ja 10^{-6} - 10^{-4} olivat duplikaatteina. Näytteet ja negatiiviset kontrollit (H₂O) ajettiin duplikaatteina. Näytteet jaettiin kahteen ajoon ja ajettiin erikseen *cyp1a1*- ja *2b1*-alukkeilla, joten qPCR-näyteajoja oli teoriassa yhteensä 4. Suunniteltu pipetointikaavio oli molemmilla eri standardilla yhtenäinen näytteiden pipetoinnin kannalta. [taulukko 18]

Valmistettiin mastermix vastaamaan standardien ja näytteiden määrää + 10 % aina yhtä qPCR ajoa varten qPCR reaktioiden Master Mix [taulukko 16] mukaan. Pipetoitiin aluksi negatiiviset kontrollit (H₂O): 16 µl/putki MM + 4 µl H₂O. Tämän jälkeen pipetoitiin näytteet 16 µl MM + 4 µl 5 ng/µl CDNA (näyte). Stripit suljettiin mahdollisimman nopeasti, kun reagenssit ja näytteet pipetoitiin. Standardeihin pipetoitiin 16 µl MM ja siirryttiin DNA-laboratorioon pipetoimaan 4 µl standardia/putki. Stripit siirrettiin Rotor-Gene-laitteen roottoriin ja käynnistettiin ajo. Ajon lämpötilaohjelma ja sulamiskäyräanalyysi ovat taulukoituna. [taulukko 17]

Analyysin jälkeen RNA-eristyksen ja RT-qPCR-analyysin laatua ja luotettavuutta arvioitiin teknisesti. Tuloksia arvioitiin qPCR-analyysin laadullisen onnistumisen kannalta ja pohdittiin millaisia vaikutuksia käytetyillä menetelmillä ja qPCR-tuloksilla on AH-reseptorin biologisen mekanismin tutkimuksessa.

5 Tulokset

Opinnäytetyön koeasetelmalla saatiin osoitettua, että myös uusi AHR-agonisti (C2) aiheutti rotissa aversiota suklaalle, kuten muut aiemmin tutkitut AHR-agonistit. Puolestaan CAR-agonistilla (TPD) ei vastaavaa vaikutusta ilmennyt ollenkaan. Tutkimusten perusteella aversio näyttää liittyvän suoranaisesti AHR:n toimintaan. Opinnäytetyössä *cyp1a1*- ja *2b1* -mittausten luotettavuuden kannalta aversiota ei voida yksiselitteisesti yhdistää metaboliaentsyymien geeniekspressiotasoihin. Tuloksille pitäisi ensin suorittaa syvempää tilastollista analytiikkaa, johon *cyp2b1* metaboliaentsyymien geeniekspression tulosten laatu ei riitä. *Cyp1a1*-analyysin ryhmäkohtaiset tulokset on esitettyinä taulukossa 19.

RNA-eristystulokset on esitetty liitteessä 2 taulukoituna. [taulukko 20] Tulokset on mitattu spektrofotometrisesti ja ilmoitettu ng/µl. RNA-eristyksen laatua arvioitiin absorbanssien (A_{260}/A_{280}) arvojen suhteella, jonka kynnysarvoina jatkokäsittelyyn pidettiin 1,8–2,1. RNA-eristyksen pitoisuusvaatimus oli 200 ng/µl. Joillekin yksittäisille näytteille suoritettiin RNA-eristys toisen kerran, jos pitoisuus tai puhtaus ei ollut riittävää. Kaikissa näytteiden RNA-eristyksissä pitoisuudet ja absorbanssisuhde olivat vaaditulla tasolla, joten RNA-eristystuloksia voidaan pitää riittävän luotettavina laimennoksia, DNAasikäsittelyä, RT-reaktioita ja qPCR analyysia varten.

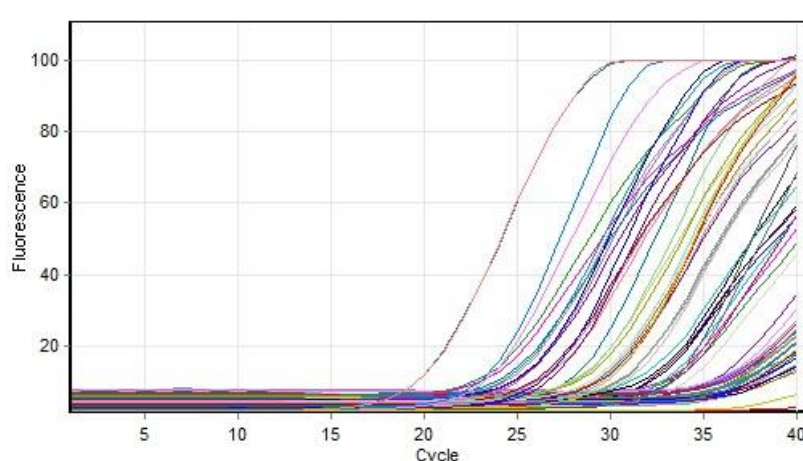
qPCR-analyysin näyteajoihin importoitii myöhemmin valmistettu standardisuora (valmistettu 2.6.2015), koska alun perin valmistetulla *cyp1a1*-standardisuoralla mittaustalue ei riittänyt näytteiden pitoisuusalueelle. Kyseisessä importoidussa standardisuorassa oli uudet laimennokset tehty samasta standardi-stokista (10^0) kuin edeltävissä standardeissa. *Cyp1a1*- ja *2b1*-standardisuorien Ct-arvot, pitoisuudet (ng/μl) ja varianssit on esitetty liitteessä 2. [taulukko 21] *Cyp1a1*- ja *2b1* -standardisuorien kvantitoidut arvot ja parametrit ovat taulukossa 18.

Taulukko 18. *Cyp1a1*- ja *2b1* -standardisuoran kvantitoidut arvot ja parametrit

Standardi	<i>Cyp1a1</i> (2.6.2015)	<i>Cyp2b1</i> (20.4.2015)
Tausta(threshold)	0,0188	0,4898
Vasen tausta	1,000	1,000
Standardisuora c	$\text{conc} = 10^{(-0,304 \cdot \text{CT} + -0,760)}$	$\text{conc} = 10^{(-0,321 \cdot \text{CT} + 1,599)}$
Standardisuora C_t	$\text{CT} = -3,287 \cdot \log(\text{conc}) + -2,496$	$\text{CT} = -3,115 \cdot \log(\text{conc}) + 4,981$
Reaktion tehokkuus (*)	1,01499 (* = $10^{(-1/m)} - 1$)	1,09449 (* = $10^{(-1/m)} - 1$)
Kulmakerroin	- 3,28653	-3,11451
Y-akselin leikkauspiste	- 2,49623	4,98144
R -arvo	0,99979	0,99397
R^2 -arvo	0,99958	0,98798

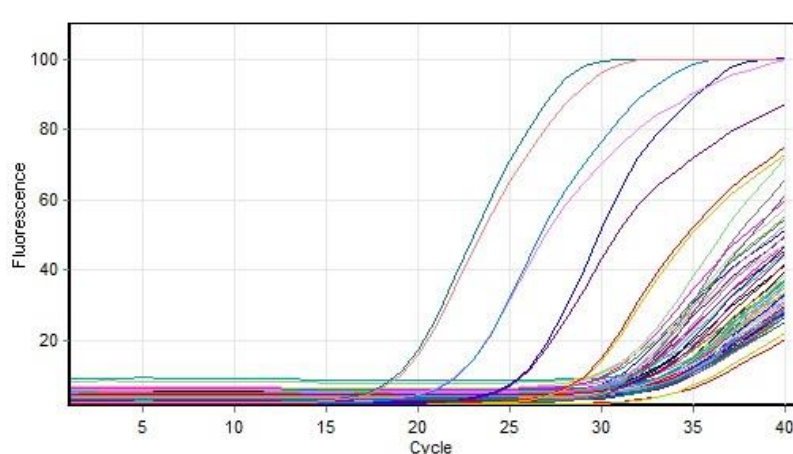
Liitteen 2 taulukko 21 prosentuaalisista eroista nähdään, että *cyp2b1*-standardisuoran herkkyys ei riittänyt samalle 10^{-10} -pitoisuuden tasolle kuin *cyp1a1*-standardisuoran.

qPCR-tulokset näytteille on esitetty liitteen 2 taulukoissa 22. ja 23. Taulukoissa on näytetuplikaattien pitoisuuksien (ng/μl) sekä Ct-arvojen keskiarvot, Ct-arvojen varianssit ja negatiivisten kontrollien Ct-arvojen keskiarvot ja varianssit.



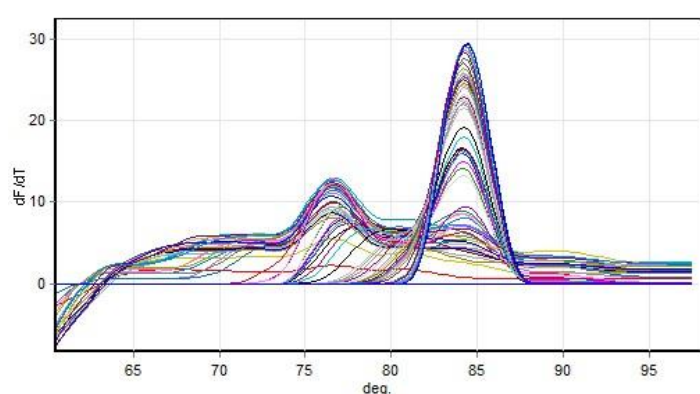
Kuva 9. *Cyp1a1* qPCR-tulokset: K1, K2.

Kuvassa 9 *Cyp1a1* näytteiden K1 ja K2 qPCR-tulokset on esitetty kuvaajana. Kuvaajissa fluoresenssin arvo on ilmoitettu syklien funktiona. Laite mittasi fluoresenssin jokaisen qPCR-syklin erillisen mitausvaiheen aikana. *Cyp1a1*:n K1- ja K2-näyteajoihin importoitii standardisuora (2.6.2015), koska kyseisen qPCR-analyysin alkuperäinen standardisuora loppui standardiin 10^{-9} -pitoisuuteen, joka ei ollut riittävä kaikille näytteiden signaaleille. [taulukko 22] *Cyp1a1*:n K3- ja K4-näyteajoihin importoitii standardisuora (2.6.2015), koska kyseisen qPCR-analyysin alkuperäinen standardisuora ei ollut tarpeeksi lineaarinen ja negatiivisen kontrollin Ct-arvo oli hyvin lähellä osaa näytteiden Ct-arvoa.



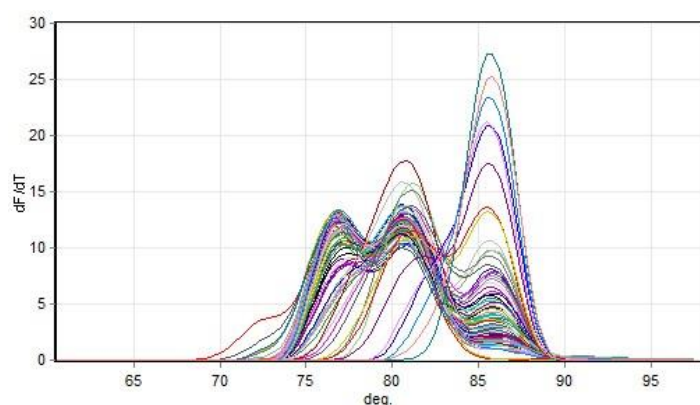
Kuva 10. *Cyp2b1* qPCR-tulokset: K1, K2

Kuvassa 10 *Cyp2b1* näytteiden K1 ja K2 qPCR-tulokset on esitetty kuvaajana. Valmistetulla *cyp2b1*-standardisuoralla lineaarinen mittausalue riitti vain osalle näytteistä, joka nähdään näytteiden signaalien suuremmilla Ct -arvoilla verrattuna standardeihin ja negatiivisiin kontroleihin.



Kuva 11. *Cyp1a1*-sulamiskäyräanalyysi (K1, K2)

Kuvassa 11 *Cyp1a1*-sulamiskäyräanalyysin tulokset on esitetty kuvaajana. Kuvaajissa näkyy fluoresenssin lasku, kun amplikonit sulavat sulamiskäyräanalyysin edetessä. Käytännössä sulamiskäyräanalyysin aikana mitatuista fluoresenssituloksista laite laski 1. asteen derivaatan ja amplikonin sulamispiste havaittiin sulamiskäyrän huipusta. Kuvasta 11. nähdään, että amplikonin sulamispiste on 84 °C luokkaa, mikä vastaa oletetun *cyp1a1* amplikonin (101 bp) sulamispistettä. Sulamiskäyrästä nähdään, että 75 -76 °C kohdalla on mahdollisesti epäspesifisien tuotteiden signaalia.



Kuva 12. *Cyp2b1*-sulamiskäyräanalyysi (K1, K2)

Kuvassa 12 *Cyp2b1* K1- ja K2-näytteiden sulamiskäyräanalyysin tulokset on esitetty kuvaajana. Sulamiskäyrän huipusta nähdään amplikonin sulamispiste. Kuvaajista nähdään, että amplikonin sulamispiste on 86 °C luokkaa, mikä vastaa oletetun amplikonin (104bp) sulamispistettä. Sulamiskäyrästä nähdään myös mahdollisesti epäspesifisten tuotteiden signaalia, joiden amplikonien sulamispisteet olisivat 75 °C tai 81 °C.

Cyp1a1-analyysin osalta ryhmäkohtaisten tulosten keskiarvot ja keskihajonnat on esitetty taulukossa 19. Ne pitoisuudet, jotka ovat jääneet standardisuoran alapuolelle, on vaihdettu alimaksi standardisuoran arvoksi (5×10^{-10}), koska standardisuoralta ei voi ekstrapoloida sen alle luotettavasti. Ryhmäkohtaisten tulosten entsyymi-induktioista voidaan näennäisesti päätellä, että C2:lla on indusoiva vaikutus *cyp1a1*:n geeniekspressioon ja TPD:llä vastaavaa vaikutusta ei syntynyt, mikä vastaa koeasetelman hypoteesia testatuista AHR- ja CAR-agonisteista.

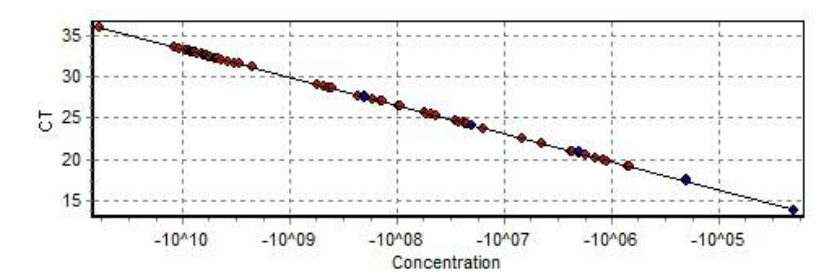
Taulukko 19. *Cyp1a1*-tulosten ryhmäkohtaiset keskiarvot ja keskihajonnat (ng/μl)

<i>Cyp1a1</i>		Ryhmä	Annos	Ka (ng/μl)	Keskihajonta (ng/μl)
K1	1 - 6	CH-223191	10 mg/kg	3,34E-09	3,99E-09
	7 - 12	Kontrolli	–	5,00E-10	1,08E-25
	13 - 18	TPD	10 mg/kg	4,06E-09	7,69E-09
K2	19 – 24	C2 + kontrolli	20 mg/kg –	4,41E-07	6,14E-07
	25 – 30	C2 + CH-223191	20 mg/kg + 10 mg/kg	3,36E-07	3,56E-07
K3	31 - 36	kontrolli	–	3,37E-09	3,30E-09
	37 - 42	C2	100 mg/kg	5,01E-07	6,82E-07
K4	43 - 48	C2 + kontrolli	4 mg/kg –	5,37E-07	4,66E-07
	49 -54	C2 + CH-223191	4 mg/kg + 14 -15 mg/kg	3,91E-07	3,39E-07

6 Tulosten tarkastelu

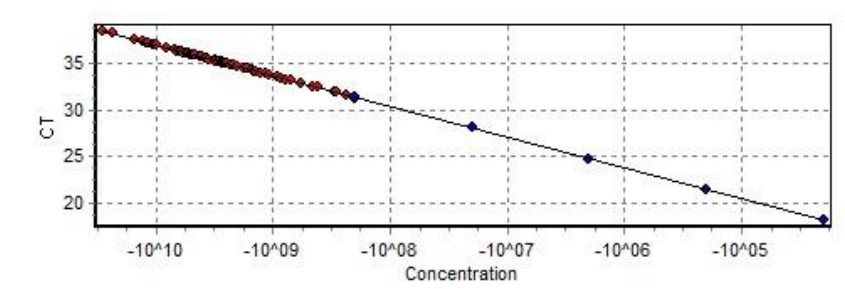
Tuloksia ja standardisuuria arvioitiin qPCR-tekniikassa toistettavuuden ja sensitiivisyyden kannalta. Toistettavuutta arvioidaan vertailemalla näyteduplikaattien ja standardisuoran triplikaattien Ct-arvojen varianssia. Standardisuoran sensitiivisyyttä arvioidaan vertaamalla näyteduplikaatin ja standarditriplikaattien välisiä Ct-arvoja. Sensitiivisyys on sitä korkeampaa, mitä alhaisemmat arvoiltaan ja virheprosentteiltaan standardisuoran Ct-arvot ovat. qPCR-reaktion herkkyys riippuu siitä, kuinka pitkälle alhaisiin pitoisuuksiin asti reaktio kykenee erottelamaan (=pitämään n. 3,2 syklin päässä toisistaan) perättäiset 10-kertaiset laimennokset. Standardisuuria arvioitiin tehokkuuden ja R^2 -parametrien perusteella. Hyväksyttävä qPCR tehokkuus analyysissä on luokkaa 90 % -110 % (0,90 - 1,10), joka kulmakertoimella tarkoittaa -3.1 – -3.58. Kalibrointisuoran arvioinnissa $R^2 < 0,95$ – arvolla voidaan olettaa, että pipetoinnissa on ollut havaittavaa virhettä tai C_T :n ja kymmenkantaisen logaritmisien DNA-konsentraation välillä ei ole ollut lineaarista yhteyttä. $R^2 > 0,985$ – arvo on luotettava alaraja suoran korrelaatiokertoimelle.

Cyp1a1-analyysin kalibrointisuoran sensitiivisyys ja luotettavuus on riittävä, koska alhaisten pitoisuuksien standardien triplikaattien väliset Ct-arvojen virheprosentit ovat pieniä. Kalibrointisuora on lineaarinen sen rajaamalla dynaamisella alueella, johon *cyp1a1* näytesignaalit asettuvat. Virheprosentit ovat melko alhaisia alhaisilla pitoisuusalueilla (0,1 % -23,5 %). Puolestaan *cyp2b1*-analyysissä kalibrointisuoran sensitiivisyys ei riitä, koska alhaisilla pitoisuuksilla standardien triplikaattien virheprosentit nousevat 10^{-10} -pitoisuusalueella todella korkeiksi (8,3 % -319,3 %). *Cyp2b1*-standardisuoran alhaiset 10^{-10} – standardit eivät ole täten lineaarisia, jolloin näytteiden pitoisuuksia ei voida määrittää luotettavasti. *Cyp1a1* standardisuoran sensitiivisyys on korkeampi kuin *cyp2b1*:sen, koska standardien Ct-arvot ovat alemmalla tasolla. *Cyp1a1* standardisuoran mittausalue on laajempi ja lineaarisempi kuin *cyp2b1*:sen. Liitteen 2. taulukossa 21 on esitetty standardisuurien varianssit.



Kuva 13. *Cyp1a1* K1 ja K2 kvantitointi standardisuoralla (2.6.2015).

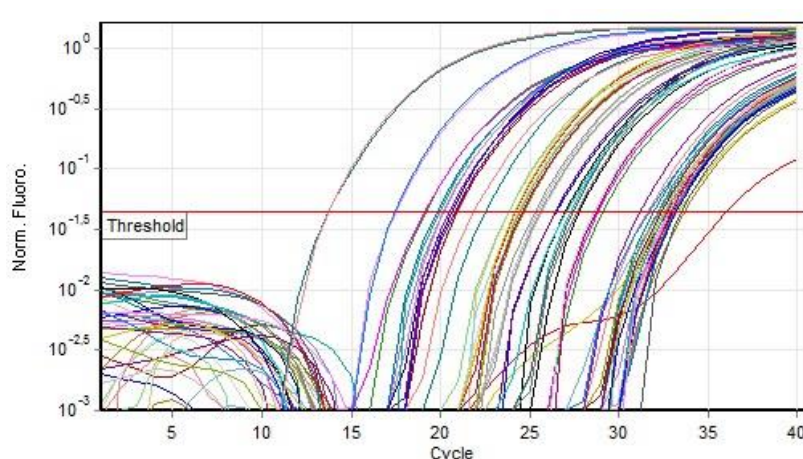
Kuvassa 13 standardisuoran *cyp1a1* tehokkuus (1,015) ja korrelaatiokerroin ($R^2=0,9996$) olivat luotettavuudeltaan hyvää tasoa. Standardisuora oli lineaarinen koko alueeltaan ja kalibrointisuoran pisteillä oli alhaiset virheprosentit. Kuvassa 14 *cyp2b1* tehokkuus (1,094) ja korrelaationkerroin ($R^2=0,9879$) olivat välttäviä, koska ne olivat melko lähellä molempien parametrien raja-arvoja, jolloin tulosten luotettavuus heikkenee. Voidaan todeta, että molempien standardisuorien tehokkuus ja korrelaation arvot täyttivät vaatimukset ja valittuja standardisuoria voidaan käyttää tulosten kvantitointiin.



Kuva 14. *Cyp2b1* K1 ja K2 kvantitointi standardisuoralla (20.4.2015).

Standardisuorien negatiiviset kontrollit eivät todennäköisesti olleet kontaminoituneita. Ne olivat standardeja alemmilla konsentraation alueella (10^{-11} - 10^{-12}), mikä nähdään liitteen 2 taulukosta 21. Osa *cyp2b1* näytteiden signaaleista oli negatiivisten kontrollien kanssa samaa suuruusluokkaa, mutta ei kuitenkaan merkittävästi alhaisemmalla tasolla, mistä myös voidaan todeta kontrollien onnistuneen tyydyttävästi. On todennäköisempää, että kyseisissä näytteissä metaboliaentsyymien RNA:ta ei ollut transkriptoitunut totaali-RNA:han taustaa ylittävää määrää, mikäli yksittäisen näytteen signaali oli samaa luokkaa negatiivisen kontrollin kanssa. Koska osa tuloksista ja negatiivisista kontrolleista oli standardisuoran mittausalueen ulkopuolella, niiden määritettyjä pitoisuuksia ei voida pitää luotettavina. Tuloksista voidaan todeta vain, että niiden pitoisuudet ovat pienempiä kuin $5 \text{ ng} \times 10^{-10}$.

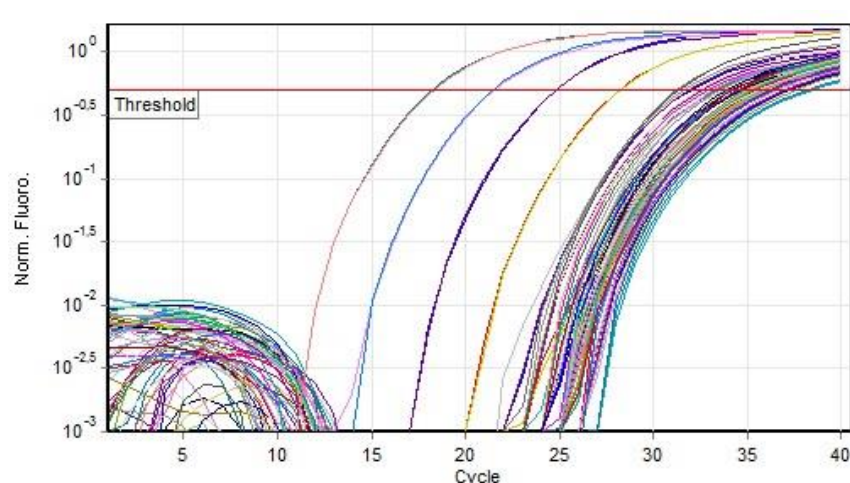
Liitteen 2 taulukossa 22 *cyp1a1* tulosten Ct-arvojen varianssien perusteella RT-qPCR-analyysi on melko toistettava, koska näytteiden Ct-varienssit olivat suurimmassa osassa alle raja-arvon ($Ct < 0,5$). Näytteellä 10, 12 ja 18 varianssien raja-arvo ylittyi niukasti, mutta sensitiivisyyttä voidaan pitää riittävänä *cyp1a1*-analyysissä. Kuvassa 15 on esitetty *cyp1a1* K1 ja K2 tulosten kvantitointi.



Kuva 15. *Cyp1a1* K1 ja K2 tulosten kvantitointi.

Kuvan 15 esittämässä *cyp1a1*-analyysissä sensitiivisyys oli riittävä, koska suurin osa näytteiden signaaleista osui standardisuoran rajaamalle lineaariselle alueelle. [taulukko 21] Standardisuora oli koko mittausalueeltaan lineaarinen ja kalibrointisuoran pisteillä oli alhaiset virheprosentit. [taulukko 20]

Liitteen 2 taulukossa 22 *cyp2b1* tulosten Ct-arvojen varianssien perusteella RT-qPCR-analyysin toistettavuus on välttävä ja heikompi kuin *cyp1a1* kvantitoinnissa. Näytteistä n. 18 % ylitti toistettavuuden raja-arvon ($Ct < 0,5$). Kuvassa 16 on esitetty *cyp2b1* K1 ja K2 tulosten kvantitointi.



Kuva 16. *Cyp2b1* K1 ja K2 tulosten kvantitointi.

Kuvan 16 esittämässä *cyp2b1*-analyysissä sensitiivisyys oli melko heikko, koska osa *cyp2b1*-näytteiden pitoisuuksista oli negatiivisten kontrollien pitoisuusalueella, eikä osunut standardisuoran lineaariselle mittausalueelle. Standardien virheprosentit alhaisilla pitoisuuksilla olivat myös melko korkeita, mikä vähentää pitoisuusmääritysten luotettavuutta. [taulukko 22] Täten signaalin voimakkuutta ei voida pitää lineaarisena syntetisoituneen tuotteen ja fluoresenssin välillä. CYP2B1-metaboliaentsyymien nukleiinihappopitoisuutta (mRNA) kyseisissä näytteissä ei voida luotettavasti määrittää johtuen qPCR-tekniikan suuresta herkkyydestä, standardisuoran mittausalueen ja lineaarisuuden riittämättömyydestä 10^{-11} -alueelle ja negatiivisista kontroleista. *Cyp2b1*-geeniekspressiotason näytteiden pitoisuuksille, jotka alittavat standardisuoran mittausalueen raja-arvon, voidaan antaa näytteelle standardisuoran raja-arvon pitoisuus (10^{-10}) tuloksia analysoitaessa. Tämä tarkoittaisi, että näytteen taustan ylittävä signaali johtui lähinnä näytteen Master Mixin ja kontaminanttien aiheuttamasta fluoresoinnista eikä syntetisoituneen metaboliaentsyymien ampikonin määrästä.

Molempien ampikonien sulamispisteet havaittiin sulamiskäyristä. Epäspesifisille piikeille ei löytynyt suoranaista selitystä sulamiskäyräanalyyseistä. Piikit voivat olla epäspesifisiä primer-dimer-tuotteita, mutta sulamislämpötiloista ei varmuudella tunnisteta muita ampikoneja. Piikit saattavat selittyä laitteen huolto- tai kalibrointitarpeesta, koska toisella Rotor-Gene-laitteella ei vastaavia epäspesifisiä piikkejä ilmennyt sulamiskäyräanalyyseistä. Esimerkiksi epäspesifiset piikit voivat olla taustakohinaa, jos laitteen fluoresenssin detektion aloituskohta ei ollut kalibroitu riittävällä tarkkuudella fluoresenssin mittausvaiheen aikana. Jatkon kannalta laitteella voisi analysoida uudestaan näytteet kalibroinnin ja huollon jälkeen, jonka jälkeen sulamiskäyriä voitaisiin verrata.

7 Yhteenveto

Eläinlääketieteellisessä tiedekunnassa tutkitaan AHR:n biologista mekanismia ja uusien AHR-agonistien vaikutuksia, minkä jatkotutkimuksiin opinnäytetyön tulokset ja työvaiheissa tuotetut materiaalit saattavat olla hyödyllisiä. Opinnäytetyön koeasetelmalla saatiin osoitettua, että myös mahalaukun kudoksissa uusi AHR-agonisti (C2) aiheutti rotissa entsyymi-induktiota, mikä saattaa olla yhteydessä havaittuun käyttäytymismuutokseen, aversioon suklaalle. Tätä aversiota ovat aiheuttaneet myös aiemmin tutkitut AHR-agonistit. Puolestaan CAR-agonistilla (TPD) ei vastaavaa vaikutusta ilmennyt ollenkaan. Tutkimusten perusteella aversio näyttää liittyvän suoraan AHR:n toimintaan.

Opinnäytetyössä eristettyä rottien mahalaukun totaali-RNA:ta ja syntetisoitua cDNA:ta voidaan käyttää uusiin geeniekspressiotasojen määrittäisiin ja tutkimuksiin, jos halutaan tehdä varmistusreaktioita jo analysoiduille metaboliaentsyymien pitoisuuksille tai tutkia muiden metaboliaentsyymien pitoisuuksia samoista näytteistä. Säilöttyjä ja käsiteltyjä näytemateriaaleja riittää satoihin qPCR-reaktioihin.

Opinnäytetyö onnistui osittain tavoitteessaan, koska näytteistä saatiin määritettyä kyseisten metaboliaentsyymien geeniekspressiotasot (ng/μl), mutta osa qPCR-tuloksista oli luotettavuudeltaan välttäviä. RT-qPCR on hyvin herkkä näytteen nukleinihappopitoisuuksien määrittämisessä ja hyvin alhaisilla pitoisuuksilla kalibroitisuuden mittausalue on haastava saada lineaariseksi. *Cyp1a1*-analyysi onnistui paremmin standardisoidun sensitiivisyyden, tehokkuuden, lineaarisuuden ja tulosten toistettavuuden kannalta kuin *cyp2b1*. Molempien analyysien sulamiskäyräanalyyseissä oli tunnistettujen ampikonien sulamispisteen lisäksi epäspesifistä käyriä, joiden virhelähdettä ei voitu opinnäytetyön puitteissa päätellä.

Teknisesti opinnäytetyön menetelmät suoritettiin onnistuneesti RNA-eristyksen ja cDNA:n sekä qPCR-standardien synteessin kannalta. RT-qPCR-menetelmän metaboliaentsyymien geeniekspressiotasojen tulokset olivat pitoisuuksiltaan *cyp1a1*:n osalta melko luotettavia ($R^2=0,9996/E=1,01499$) ja *cyp2b1*:lle määritetyt pitoisuudet olivat luotettavuuden alarajoissa ($R^2=0,9879/E=1,09449$). Kalibroitisuuden lineaarinen mittausalue ei aina riittänyt, varsinkaan *cyp2b1*-analyysin tapauksessa, näytteiden alhaiselle pitoisuusalueelle. Tulosten luotettavuutta on syytä pohtia sulamiskäyräanalyyseiden kannalta. Käyrien epäspesifisten signaalien perusteella analyysilaitteelle olisi hyvä suorittaa vianetsintää.

Opinnäytetyön näytteiden tuloksista vain osaa voidaan käyttää niiden luotettavuuden kannalta syvempään tilastolliseen käsittelyyn, josta voidaan tehdä päätelmiä AHR:n biologisesta mekanismista. *Cyp1a1*- ja *cyp2b1* -mittausten luotettavuuden ja analyysin sulamiskäyrien perusteella opinnäytetyössä aversiota ei voida yksiselitteisesti yhdistää metaboliaentsyymien geeniekspressiotasoihin. Syvempää tilastollista tarkastelua varten osalle näytteistä, varsinkin *cyp2b1*-mittausten kannalta, olisi suoritettava uudet RT-qPCR-reaktiot. Mahalaukun kudosten metaboliaentsyymien geeniekspressiotasoja voidaan verrata muihin saman koeasetelman rottien kudoksien tuloksiin.

Tutkimuksien jatkamisen kannalta laitteen voisi kalibroida tai suorittaa analyysin uudelleen toisella Rotor-Gene-laitteella. Laitteen kalibroinnin tai muun huollon jälkeen näytteiden cDNA:lle voisi suorittaa opinnäytetyön kuvaaman ja mukaisen RT-qPCR-analyysin. Uusia tuloksia voitaisiin verrata aikaisempiin analyysieihin ja sulamiskäyriin mahdollista laitteen vikaa paikannettaessa.

Lähteet

- [1] Schmidt, J. V., & Bradfield, C. A. (1996). Ah receptor signaling pathways. *Annual review of cell and developmental biology*, 12(1), 55-89.
- [2] Denison, M. S., & Nagy, S. R. (2003). Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals*. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 43(1), 309-334.
- [3] Xu, C., Li, C. Y. T., & Kong, A. N. T. (2005). Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. *Archives of pharmacal research*, 28(3), 249-268.
- [4] Anzenbacher, P., & Anzenbacherova, E. (2001). Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 58(5-6), 737-747.
- [5] Pohjanvirta, R., & Tuomisto, J. (1994). Short-term toxicity of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in laboratory animals: effects, mechanisms, and animal models. *Pharmacological reviews*, 46(4), 483-549.
- [6] Lensu, S. (2014). No chocolate, please!-dioxin-induced responses in feeding related behaviour and in neuronal activity. *Tutkimus: 2014_146*. Verkkodokumentti < <http://urn.fi/URN:ISBN:978-952-302-354-3> >
- [7] S.Mahiout, V. Pustyl'nyak, R.Pohjanvirta.(2015). The role of the AH-receptor in aversion to novel food items in rats. *The Official Journal of the Society of Toxicology, Volume 144, Issue 1*, PS 2323
- [8] Lensu, S., Tuomisto, J. T., Tuomisto, J., Viluksela, M., Niittynen, M., & Pohjanvirta, R. (2011). Immediate and highly sensitive aversion response to a novel food item linked to AH receptor stimulation. *Toxicology letters*, 203(3), 252-257.
- [9] DNA detection with SYBR Green I dye. Verkkodokumentti. Gene Quantification. <<http://www.gene-quantification.de/chemistry.html#sybrgreenz>> 30.10.2015
- [10] EvaGreen: a PCR dye Safe to the Environment. Verkkodokumentti. Biotium. < http://216.19.65.49/product/product_info/Newproduct/EvaGreen.asp >30.10.2015
- [11] Mao, F., Leung, W. Y., & Xin, X. (2007). Characterization of EvaGreen and the implication of its physicochemical properties for qPCR applications. *BMC biotechnology*, 7(1), 76.
- [12] Evagreen product information. Verkkodokumentti. Biotium. < <http://www.gene-quantification.de/evagreen-productinfo.pdf> > 30.10.2015
- [12] Walker, N. J., Miller, B. D., Kohn, M. C., Lucier, G. W., & Tritscher, A. M. (1998). Differences in kinetics of induction and reversibility of TCDD-induced changes in cell proliferation and CYP1A1 expression in female Sprague-Dawley rat liver. *Carcinogenesis*, 19(8), 1427-1435.
- [13] Cyp1a1 cytochrome P450, family 1, subfamily a, polypeptide 1 [*Rattus Norvegicus*]. Verkkodokumentti. NCBI. < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/24296> >. 14.10.2015

- [14] Cyp2b1 cytochrome P450, family 2, subfamily b, polypeptide 1 [*Rattus Norvegicus*]. Verkkodokumentti. NCBI. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/24300>>. 14.10.2015
- [15] *Ahr* aryl hydrocarbon receptor [*Rattus Norvegicus*]. Verkkodokumentti. NCBI. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/24296>> 30.10.2015
- [16] *Nr1i3* (CAR) nuclear receptor subfamily 1, group I, member 3 [*Rattus Norvegicus*]. Verkkodokumentti. NCBI. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/65035>> 30.10.2015
- [17] Bersten, D. C., Sullivan, A. E., Peet, D. J., & Whitelaw, M. L. (2013). BHLH-PAS proteins in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 13(12) Figure 2, 827 -841.
- [18] 2, 3, 7, 8- tetraklooridibentso-*p*-dioksiini (TCDD). Verkkodokumentti. Chemspider. <<http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.14865.html>>. Kuva.14.10.2015
- [19] Structure and Dimerization Properties of the Aryl Hydrocarbon Receptor (AHR) Pas-A Domain. Verkkodokumentti. RCSB. <<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=4M4X>>. Kuva. 14.10.2015
- [20] Shigeaki Kato, Yoshiaki Fujii-Kuriyama, Fumiaki Ohtake (2007). A new signaling pathway of dioxin receptor ligands through targeted protein degradation. *AATEX 14, special Issue*, 487-494.
- [21] Shimada, T. (2006). Xenobiotic-metabolizing enzymes involved in activation and detoxification of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Drug metabolism and pharmacokinetics*, 21(4), 257 -276.
- [22] 2006. Real-Time PCR Applications Guide. Bio-Rad Laboratories, Inc
- [23] Eurogentec. 2009. qPCR guide.
- [24] Sigma. 2004. qPCR Technical Guide.

LIITE 1. Rottien koeasetelma ja materiaalit

Näyte		Ryhmä	Yhdiste	Annos (mg/kg)
K1	1 -6	testiryhmä	CH-223191	10
	7 -12	kontrolli	-	-
	13 -18	testiryhmä	TPD	10
K2	19 -24	testiryhmä	C2	20
			-	-
	25 -30	testiryhmä	C2	20
			CH-223191	10
K3	31 -36	kontrolli	-	
	37 -42	testiryhmä	C2	100
K4	43 -48	C2 + kontrolli	C2	4
			-	-
	49- 54	C2 + CH-223191	C2	4
			CH-223191	14 -15
	55	testinäyte	TPD	10

Materiaalit	
Auringonkukka öljy	Keiju, Bunge Finland Oy, Raisio, Suomi
Suklaa	Panda maitosuklaa, Vaajakoski, Suomi
TPD	(XXX, CAS XXX): from Dr. Vladimir Pustyl'nyak
CH-223191	1-Methyl-N-[2-methyl-4-[2-(2-methylphenyl)diazonyl]phenyl]-1H-pyrazole-5-carboxamide, 2-Methyl-2H-pyrazole-3-carboxylic acid (2-methyl-4-o-tolylazo-phenyl)-amide; CAS 301326-22-2): Sigma (C8124-25MG)
C2	N-acetyl-N-Phenyl-4-Acetoxy-5-chloro-1,2-dihydro-1-methyl-2-oxo-quinoline-3-carboxamide
PEG-400	CAS: 25322-68-3, Ph.Eur.grade, manufacturer Fluka, Sigma 81172
DMSO	Dimethyl sulfoxide Hybri-Max; CAS: 67-68-5): Sigma (D2650-5x5ML)

LIITE 2. Mittaustulokset

Taulukko 20. Näytteiden 1-55 RNA-eristys-tulokset

Näyte	c(ng/μl)	A260/280	A260/230	Näyte	c(ng/μl)	A260/280	A260/230
1	360,80	2,01	1,49	29	1036,06	1,98	1,98
2	695,50	1,98	1,97	30	1005,47	1,98	1,97
3	780,14	1,97	1,96	31	448,98	1,97	1,80
4	710,35	1,99	1,87	32	1031,26	1,98	2,02
5	369,87	2,01	1,86	33	519,80	1,95	1,89
6	453,87	1,99	1,85	34	431,41	1,97	1,92
7	778,12	2,00	1,86	35	592,87	1,94	1,90
8	1158,19	1,99	2,04	36	1052,15	1,97	2,01
9	661,93	1,97	1,76	37	1044,69	1,98	2,01
10	618,79	1,97	1,90	38	900,76	1,99	2,03
11	790,81	1,99	1,97	39	856,97	1,97	1,99
12	887,48	1,98	1,91	40	1041,69	2,00	1,94
13	416,63	1,98	1,89	41	557,47	1,97	1,88
14	324,65	2,00	1,65	42	894,78	1,98	2,02
15	582,19	1,97	1,70	43	1117,71	1,99	2,00
16	887,36	2,00	2,02	44	1008,12	1,99	2,04
17	856,96	1,99	1,54	45	982,05	1,99	2,03
18	1066,74	2,00	2,04	46	903,37	1,98	2,02
19	1013,97	2,00	1,91	47	647,95	1,96	1,93
20	529,54	1,99	1,92	48	282,00	2,00	1,74
21	1025,10	1,98	2,04	49	708,64	1,98	1,34
22	552,25	2,00	1,92	50	961,10	1,98	1,82
23	1118,18	1,98	1,65	51	222,21	1,98	1,55
24	647,97	1,98	1,95	52	1017,88	1,97	1,89
25	558,85	1,96	1,97	53	856,53	1,97	1,97
26	686,47	1,95	1,92	54	814,87	1,96	1,96
27	953,73	1,99	2,04	55	468,42	1,98	1,91
28	572,85	1,94	1,99				

Taulukko 21. Cyp1a1 ja Cyp2b1 standardisuurien Ct-arvot, pitoisuudet(ng/μl) ja virheprosentit

Standardi	Tyyppi	Ct-arvo	c(an- nettu)=ng/μl	c(las- kettu)=ng/μl	Virhepro- sentti
Cyp1a1(2.6.2015)	H2O	31,67		4,01E-11	
	H2O	34,06		7,52E-12	
	10 ¹⁰	27,77	5,00E-10	6,17E-10	23,5 %
	10 ¹⁰	28,31	5,00E-10	4,24E-10	15,3 %
	10 ¹⁰	27,89	5,00E-10	5,67E-10	13,5 %
	10 ⁹	24,83	5,00E-09	4,86E-09	2,9 %
	10 ⁹	24,88	5,00E-09	4,67E-09	6,7 %
	10 ⁹	24,79	5,00E-09	4,97E-09	0,6 %
	10 ⁸	21,76	5,00E-08	4,17E-08	16,6 %
	10 ⁸	21,44	5,00E-08	5,22E-08	4,4 %
	10 ⁸	18,26	5,00E-08	4,82E-07	3,6 %
	10 ⁷	18,26	5,00E-07	4,83E-07	3,4 %
	10 ⁷	14,75	5,00E-07	5,64E-06	12,8 %
	10 ⁶	14,89	5,00E-07	5,12E-06	2,4 %
	10 ⁶	14,93	5,00E-06	5,00E-06	0,1 %
	10 ⁶	14,87	5,00E-06	5,22E-06	4,3 %
	10 ⁵	11,71	5,00E-05	4,76E-05	4,8 %
	10 ⁵	11,72	5,00E-05	4,72E-05	5,7 %
	10 ⁴	8,34	5,00E-04	5,03E-04	0,7 %
	10 ⁴	8,27	5,00E-04	5,30E-04	6,1 %
Cyp2b1(20.4.2015)	H2O	35,47		4,01E-11	
	H2O	36,12		7,52E-12	
	10 ¹⁰	32,87	5,00E-10	1,11E-09	122,1 %
	10 ¹⁰	32,01	5,00E-10	2,10E-09	319,3 %
	10 ¹⁰	34,07	5,00E-10	4,59E-10	8,3 %
	10 ⁹	31,38	5,00E-09	3,34E-09	33,2 %
	10 ⁹	31,68	5,00E-09	2,68E-09	46,3 %
	10 ⁹	31,54	5,00E-09	2,98E-09	40,5 %
	10 ⁸	28,23	5,00E-08	3,43E-08	31,4 %
	10 ⁸	27,80	5,00E-08	4,72E-08	5,6 %
	10 ⁸	28,06	5,00E-08	3,90E-08	22,0 %
	10 ⁷	25,06	5,00E-07	3,59E-07	28,3 %
	10 ⁷	25,20	5,00E-07	3,23E-07	35,5 %
	10 ⁷	24,63	5,00E-07	4,90E-07	2,1 %
	10 ⁶	21,50	5,00E-06	4,97E-06	0,7 %
	10 ⁶	21,62	5,00E-06	4,55E-06	9,1 %
	10 ⁵	18,33	5,00E-05	5,17E-05	3,3 %
	10 ⁵	18,20	5,00E-05	5,68E-05	13,7 %
	10 ⁴	14,68	5,00E-04	7,68E-04	53,5 %
	10 ⁴	14,74	5,00E-04	7,35E-04	47,0 %

Taulukko 22. Näyteduplikaattien Cyp1a1- pitoisuuksien(ng/μl) ja Ct-arvojen keskiarvot, Ct-arvojen varianssit ja negatiivisten kontrollien(H2O) Ct-arvojen keskiarvo ja varianssi.

Cyp1a1			
Näyte	Ct-arvo(Ka.)	Ct: varianssit	c(ng/μl)(ka.)
1	25.16	0.0002	1.04E-08
2	31.35	0.32	1.42E-10
3	30.58	0.0968	2.37E-10
4	27.865	0.02205	1.57E-09
5	25.82	0.0002	6.54E-09
6	31.67	0.0968	1.1E-10
7	30.97	0.0968	1.8E-10
8	31.885	0.06125	9.45E-11
9	31.53	0.0968	1.22E-10
10	31.635	0.99405	1.25E-10
11	31.76	0.18	1.04E-10
12	30.865	1.42805	2.26E-10
13	27.535	0.00605	1.98E-09
14	24.2	0.0288	2.04E-08
15	32.155	0.12005	7.85E-11
16	31.545	0.15125	1.21E-10
17	31.56	0.3528	1.23E-10
18	30.925	0.91125	2.04E-10
19	21.07	0.2312	1.89E-07
20	17.945	0.00845	1.64E-06
21	26.48	0.1458	4.2E-09
22	22.645	0.00125	6.06E-08
23	23.26	0.045	3.97E-08
24	19.115	0.00405	7.21E-07
25	19.885	5E-05	4.2E-07
26	23.47	0.0128	3.42E-08
27	18.76	0.0098	9.22E-07

28	19.405	5E-05	5.87E-07
29	23.315	0.03645	3.82E-08
30	24.46	0.0018	1.71E-08
31	26.995	0.01125	2.98E-09
H20	31.245	0.36125	-
32	32.66	0.0512	5.66E-11
33	25.365	0.06845	9.39E-09
34	26.34	0.2312	4.84E-09
35	27.575	0.14045	2.02E-09
36	31.35	0.0008	1.41E-10
37	20.685	0.03645	2.49E-07
38	22.325	5E-05	7.86E-08
39	17.75	0.0008	1.94E-06
40	19.855	0.00245	4.43E-07
41	21.885	0.00605	1.07E-07
42	21.055	0.01805	1.91E-07
43	20.865	0.02645	2.19E-07
44	21.64	0.0032	1.27E-07
45	20.14	0.0002	3.64E-07
46	20.74	0.1058	2.42E-07
47	18.815	0.00405	9.18E-07
48	18.26	0.0002	1.35E-06
49	20.435	0.04805	2.98E-07
50	22.125	0.03645	9.05E-08
51	18.66	0.0032	1.02E-06
52	20.51	0.0032	2.81E-07
53	22.115	0.04205	9.12E-08
54	19.505	0.00045	5.64E-07
55	21.575	0.00245	1.33E-07
H20	32.635	2.85605	-

Taulukko 23. Näyteduplikaattien Cyp2b1- pitoisuuksien(ng/μl) ja Ct-arvojen keskiarvot, Ct-arvojen varianssit ja negatiivisten kontrollien(H2O) Ct-arvojen keskiarvo ja varianssi.

Cyp2b1			
Näyte	Ct-arvo(ka.)	Ct: varianssit	c(ng/μl)(ka.)
1	31.925	0.00245	3.42E-09
2	37.745	0.39605	6.06E-11
3	35.945	0.00605	2.05E-10
4	34.37	0.0338	6.17E-10
5	34.1	0.0128	7.44E-10
6	35.16	0.0338	3.56E-10
7	37.17	0.0338	8.69E-11
8	36.84	0.32	1.13E-10
9	35.97	0.1682	2.05E-10
10	37.25	0.18	8.36E-11
11	37.845	0.73205	5.88E-11
12	37.08	0.0242	9.24E-11
13	32.49	0.0098	2.3E-09
14	31.6	0.0002	4.28E-09
15	36.075	0.02205	1.87E-10
16	35.605	0.01805	2.59E-10
17	35.14	0.0072	3.58E-10
18	35.7	1.7298	2.95E-10
19	35.075	0.09245	3.8E-10
20	33.085	0.09245	1.53E-09
21	34.43	0.1152	5.99E-10
22	33.655	0.03125	1.02E-09
23	36.055	0.00125	1.89E-10
24	33.305	0.03645	1.3E-09
25	35.23	2.205	4.33E-10
26	35.07	0.0032	3.76E-10
27	35.815	0.59405	2.4E-10

28	34.135	0.14045	7.37E-10
29	35.885	0.21125	2.18E-10
30	35.46	0.3528	2.99E-10
31	34.225	0.14045	2.82E-10
H2O	35.21	0.1352	-
32	37.475	0.57245	2.48E-11
33	31.82	0.02	1.75E-09
34	32.375	0.04205	1.15E-09
35	33.935	0.00845	3.46E-10
36	37.905	0.26645	1.71E-11
37	35.905	0.03125	7.66E-11
38	36.295	0.11045	5.75E-11
39	36.365	0.00125	5.34E-11
40	36.875	0.00045	3.61E-11
41	32	0.0162	1.53E-09
42	34.02	0.0162	3.25E-10
43	35.16	0.1352	1.37E-10
44	36.255	1.63805	7.26E-11
45	35.53	1.2168	1.2E-10
46	35.205	0.70805	1.44E-10
47	32.285	0.00125	1.23E-09
48	28.825	0.00405	1.74E-08
49	34.76	0.5	1.97E-10
50	35.08	1.4112	1.74E-10
51	30.015	0.03125	7E-09
52	35.88	0.3362	8.13E-11
53	33.22	0.0032	5.96E-10
54	32.14	0.02	1.37E-09
55	30.615	5E-05	4.41E-09
H2O	35.215	0.59405	-